

Instituto Tecnológico y de Estudios Superiores de Occidente

Reconocimiento de validez oficial de estudios de nivel superior según acuerdo secretarial 15018, publicado en el Diario Oficial de la Federación del 29 de noviembre de 1976.

Departamento de Procesos Tecnológicos e Industriales
Maestría en Ingeniería y Gestión de la Calidad



IMPLEMENTACIÓN DE UN PROGRAMA LEAN-SIX SIGMA PARA LA OPTIMIZACIÓN DEL PROCESO DE PRODUCCIÓN DE PROBIÓTICOS

TESIS que para obtener el **GRADO** de
MAESTRO EN INGENIERÍA Y GESTIÓN DE LA CALIDAD

Presenta: **IBQ. JOSÉ CARLOS PEÑA PARTIDA**

Director **DR. ÓSCAR ARIEL ROJAS REJÓN**

Codirector **DR. JOSÉ PABLO TORRES MORÁN**

Tlaquepaque, Jalisco. 5 de diciembre de 2018.

RESUMEN

Palabras clave: *Lean-Six Sigma*, probióticos, optimización, regresión no lineal, diseño de experimentos.

En este trabajo se desarrolló un plan *Lean-Six Sigma* de diseño para la optimización del proceso de producción de microorganismos probióticos. Se evaluó el proceso fermentativo de dos cepas bacterianas y una levadura, *Lactobacillus rhamnosus* (LR), *Lactobacillus plantarum* (LP) y *Saccharomyces boulardii* (SB) en biorreactores a escala laboratorio (0.25 L). El crecimiento microbiano se caracterizó en cultivo por lote utilizando medio comercial MRS para LR y LP, y medio comercial YPD para SB. Los tres microorganismos mostraron velocidades específicas de crecimiento ($\mu_{\text{máx}}$) similares a las reportadas en la literatura: 0.434 h^{-1} , 0.426 h^{-1} y 0.545 h^{-1} , respectivamente. A partir del análisis de los resultados de diseños experimentales factoriales y de superficie de respuesta (RSM), se optimizó un medio (MBT) a base de melazas de betabel, azúcar y extracto de té verde (*Camellia sinensis*) como un sustituto económico de los medios comerciales. Posteriormente, se analizó el efecto del medio optimizado sobre las condiciones de crecimiento de los microorganismos; para ello se evaluaron las condiciones de operación del bioproceso en cultivos por lote, continuo y lote alimentado. Tras la optimización, fue posible igualar las concentraciones obtenidas con los medios comerciales ($>10^7 \text{ UFC mL}^{-1}$ para LP, $>10^8 \text{ UFC mL}^{-1}$ para LR y $>10^9 \text{ UFC mL}^{-1}$ para SB). Posteriormente, para la implementación del plan *Lean*, se evaluó el proceso productivo a escala piloto definiendo una línea base de producción de 7 kg; con ello se diseñó el mapa de cadena de valor (VSM) del proceso, con el cual se implementó un plan 5S para optimizar el proceso y generar un plan de trabajo estandarizado. Finalmente, se implementó un plan *Six Sigma*, utilizando la caracterización del bioproceso para desarrollar las etapas de medición y análisis y generando estrategias de implementación y control a futuro para el bioproceso en etapa piloto.

CONTENIDO

JUSTIFICACIÓN.....	15
OBJETIVOS.....	17
Objetivo General 1	17
Objetivos Particulares 1	17
Objetivo General 2	17
Objetivos Particulares 1	18
ALCANCES.....	19
ÍNDICE DE SIGLAS Y ABREVIATURAS	21
CAPÍTULO I.....	2
SÍNDROME METABÓLICO.....	2
1. ENFERMEDADES NO TRANSMISIBLES	3
1.1. Situación Mundial.....	3
1.2. Situación en México	4
1.3. Programas de prevención y administración de las enfermedades no transmisibles.....	5
1.4. Enfermedades no transmisibles relacionadas con el síndrome metabólico	9
1.4.1. Obesidad y sobrepeso.....	9
1.4.2. Diabetes Mellitus.....	10
1.4.3. Resistencia a la insulina	11
1.4.4. Procesos bioquímicos relacionados con el SM y la RI	12
CAPÍTULO II	14
PROBIÓTICOS Y PREBIÓTICOS	14
1. MICROBIOMA HUMANO	15
2. PROBIÓTICOS	17
2.1. Definición	17

2.2. Clasificación biológica.....	18
2.3. Estudios previos relacionados con efectos benéficos sobre el MetS	19
2.4. Aplicaciones y situación del mercado mundial de probióticos.....	23
3. PREBIÓTICOS	27
3.1.....	27
3.1. Definición	27
CAPÍTULO III	30
MODELOS ESTADÍSTICOS RELACIONADOS CON SISTEMAS BIOLÓGICOS.....	30
1. MODELOS ESTADÍSTICOS	31
1.1. Antecedentes	31
1.2. Bioestadística y modelado empírico	33
1.2.1. Cinética de crecimiento microbiano.....	33
1.2.2. Modelos de regresión no lineales y su relación con los parámetros cinéticos de microorganismos	35
CAPÍTULO IV	37
METODOLOGÍAS <i>LEAN-SIX SIGMA</i>	37
1. METODOLOGÍAS DE CALIDAD PARA PROCESOS BIOLÓGICOS	38
1.1. Perspectivas.....	38
1.2. Implementación de <i>Lean – Six Sigma</i>	40
CAPÍTULO V	43
ESTRATEGIA DE IMPLEMENTACIÓN	43
1. IMPLEMENTACIÓN DE LA METODOLOGÍA <i>LEAN</i>	44
1.1. DESCRIPCIÓN DEL PROCESO DE PRODUCCIÓN	44
1.1.1. DISEÑO DEL DIAGRAMA DE FLUJO DEL PROCESO	45
1.2. DEFINICIÓN DE LA DEMANDA Y NECESIDADES DEL CLIENTE	46

1.2.1.	DESPLIEGUE DE LA FUNCIÓN DE CALIDAD	46
1.2.2.	MAPEO DE LA CADENA DE VALOR (VSM)	48
1.2.3.	CÁLCULO DEL <i>TAKT-TIME</i> Y DEL <i>PITCH</i>	48
1.3.	FLUJO CONTINUO DEL PROCESO	50
1.3.1.	DIAGNÓSTICO DEL PROCESO PARA IMPLEMENTACIÓN DE LAS 5'S Y SU ESTANDARIZACIÓN	50
1.4.	BALANCE DEL PROCESO	51
1.4.1.	BALANCE DE CARGA DE TRABAJO	51
2.	IMPLEMENTACIÓN DE LA METODOLOGÍA <i>SIX-SIGMA</i> : DMAIC.....	51
2.1.	DEFINICIÓN DEL PROBLEMA	51
2.1.1.	<i>Project Charter</i>	51
2.1.2.	Formato A3	52
2.2.	MEDICIÓN.....	53
2.2.1.	PLAN DE COLECCIÓN DE DATOS X Y	53
2.2.2.	CARACTERIZACIÓN DE LOS PARÁMETROS CINÉTICOS DE CRECIMIENTO DE LOS TRES MICROORGANISMOS EN MEDIOS COMERCIALES	
	53	
2.2.2.1.	DESCRIPCIÓN DEL PROCEDIMIENTO	53
2.2.2.2.	DIAGRAMA DEL PROCESO	54
2.2.3.	FUNDAMENTO DE LAS TÉCNICAS ANALÍTICAS	55
2.2.3.1.	Crecimiento por peso seco	55
2.2.3.2.	Crecimiento por densidad óptica.....	55
2.2.3.3.	Conteo en placa	56
2.2.3.4.	Carbohidratos totales por el método de la antrona	57
2.2.3.5.	Carbohidratos reductores por el método de Miller.....	58
2.2.3.6.	Ácido láctico por el método modificado de Borshchevskaya y colaboradores..	59

2.2.4.	VIABILIDAD, DISEÑO Y OPTIMIZACIÓN DEL MEDIO DE CULTIVO MBT	59
2.2.4.1.	DESCRIPCIÓN DEL PROCEDIMIENTO	59
2.2.4.2.	Definición de las condiciones óptimas para la extracción de té verde	60
2.2.4.3.	Optimización del medio de cultivo MBT.....	60
2.2.4.4.	Definición de las condiciones óptimas para la esterilización del medio MBT ..	61
2.2.4.5.	Evaluación del impacto de metabolitos secundarios sobre el cometabolismo de los microorganismos probióticos	61
2.2.5.	CARACTERIZACIÓN DE LAS VARIABLES REOLÓGICAS DEL MEDIO DE CULTIVO MBT.....	62
2.2.5.1.	Viscosidad por el método del viscosímetro Brookfield	62
2.2.5.2.	Densidad por el método del picnómetro de Bingham	63
2.2.5.3.	Capacidad de las bombas peristálticas	63
2.2.6.	DIAGRAMA DEL PROCESO	65
2.2.7.	FUNDAMENTO DE LAS TÉCNICAS ANALÍTICAS	65
2.2.7.1.	Contenido fenólico total por el método de Folin-Ciocalteau	66
2.2.8.	CARACTERIZACIÓN DE LOS PARÁMETROS CINÉTICOS DE CRECIMIENTO DE LOS TRES MICROORGANISMOS EN EL MEDIO OPTIMIZADO MBT	67
2.2.8.1.	DESCRIPCIÓN DEL PROCEDIMIENTO	67
2.2.8.2.	DIAGRAMA DEL PROCESO	68
2.2.8.3.	FUNDAMENTO DE LAS TÉCNICAS ANALÍTICAS	69
2.3.	ANÁLISIS	69
2.3.1.	EVALUACIÓN DE LAS CINÉTICAS DE CRECIMIENTO DE LOS MICROORGANISMOS PROBIÓTICOS EN CULTIVOS MIXTOS.....	69
2.3.1.1.	Definición de los parámetros cinéticos en cultivos por lote y medios comerciales	69

2.3.1.2.	Evaluación de los parámetros cinéticos en cultivos por lote en medio MBT	70
2.3.1.3.	Evaluación de los bioprocesos en cultivos por lote, continuo y lote alimentado en medio MBT y su comparación contra los bioprocesos en medios comerciales	70
CAPÍTULO VI		72
RESULTADOS Y DISCUSIÓN		72
1.	IMPLEMENTACIÓN DE LA METODOLOGÍA <i>LEAN</i>	73
1.1.	AJUSTE DEL DIAGRAMA DE FLUJO DEL PROCESO	73
1.2.	DEFINICIÓN DE LA DEMANDA Y NECESIDADES DEL CLIENTE	74
1.2.1.	DESPLIEGUE DE LA FUNCIÓN DE CALIDAD	74
1.3.	MAPEO DE LA CADENA DE VALOR (VSM)	80
1.4.	CÁLCULO DEL TAKT-TIME	80
1.5.	FLUJO CONTINUO DEL PROCESO	82
1.5.1.1.	IMPLEMENTACIÓN DE LAS 5'S	82
1.5.1.2.	<i>SEIRI</i> (SELECCIONAR) Y <i>SEITON</i> (ORDENAR)	84
1.5.1.3.	<i>SEISO</i> (LIMPIEZA)	84
1.5.1.4.	<i>SEIKETSU</i> (ESTANDARIZAR) Y <i>SHITSUKI</i> (DISCIPLINA)	86
1.6.	BALANCE	91
1.6.1.	BALANCE DE LAS CARGAS DE TRABAJO	91
1.6.2.	RESULTADOS DE LA IMPLEMENTACIÓN DE LAS 5'S	92
2.	IMPLEMENTACIÓN DE LA METODOLOGÍA <i>DMAIC</i> DE <i>SIX SIGMA</i>	94
2.1.	DEFINICIÓN DEL PROBLEMA	94
2.1.1.	<i>Project Charter</i>	94
2.1.2.	A3 del proceso	96
2.1.2.1.	Descripción del problema	96
2.1.2.2.	Definición del problema	98

2.1.2.3.	Metas	100
2.1.2.4.	Análisis de la causa – raíz	100
2.1.2.5.	Herramientas para medición y análisis.....	101
2.1.2.6.	Tiempos y actividades	101
2.2.	MEDICIÓN.....	103
2.2.1.	Plan de colección de datos X Y	103
2.3.	ANÁLISIS	103
2.3.1.	Caracterización de los parámetros cinéticos de crecimiento de los tres microorganismos en medios comerciales.....	103
2.3.2.	Caracterización de los parámetros cinéticos de crecimiento de los tres microorganismos en medios MBT por lotes	118
2.3.3.	Evaluación del comportamiento del bioproceso en cultivo continuo y lote alimentado en medio MBT	124
2.3.4.	Viabilidad, diseño y optimización del medio de cultivo MBT	127
2.3.4.1.	Diseño factorial 3^2 para la definición de las condiciones óptimas para la extracción de té verde.....	128
2.3.4.2.	Diseño RSM para la optimización de la formulación del medio MBT.....	130
2.3.4.3.	Diseño factorial 3^2 para la definición de las condiciones óptimas para la esterilización del medio MBT	136
2.3.4.4.	Evaluación del impacto de metabolitos secundarios.....	139
2.3.4.5.	Caracterización fisicoquímica y microscópica del medio MBT y de los microorganismos LP, LR y SB	142
2.4.	MEJORA Y CONTROL.....	144
2.4.1.	Resultado de las mejoras implementadas durante el escalamiento del proceso de producción de probióticos por CCLA y análisis de modo y efecto de falla (AMEF).....	144
3.1.1.	Análisis y comparación de costos de medios de cultivo	148
CAPÍTULO VII.....		149

CONCLUSIONES	149
BIBLIOGRAFÍA.....	153
ANEXOS.....	I
1. PROJECT CHARTER DEL PROCESO DE PRODUCCIÓN DE PROBIÓTICOS	I
2. A3 DEL PROCESO DE PRODUCCIÓN DE PROBIÓTICOS	II
3. CORRIDAS DE LOS DISEÑOS EXPERIMENTALES.....	III

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 Porcentaje de DALYs perdidos por agrupaciones de causas desde 1990 hasta 2013. ECNT: Enfermedades crónicas no transmisibles. ETMNN: Enfermedades transmisibles, maternas, neonatales y de la nutrición. (DGED, 2015).	4
Figura 2: Paquete Esencial de Intervenciones de ENT para cuidados primarios a la salud (modificado de Package of essential noncommunicable (PEN) disease interventions for primary health care in low-resource settings, 2010).	7
Figura 3: Relación entre marcadores inflamatorios y factores de enfermedades específicos en las distintas etapas patológicas desde el sobrepeso hasta la DMT2 y enfermedades cardiovasculares (modificado de Badawi et al., 2010).	10
Figura 4: Interacciones entre la insulina y ácidos grasos en la síntesis de moléculas proinflamatorias (modificado de Badawi et al., 2010).	13
Figura 5: Gráfico de caja de la variación en la abundancia de género de los 30 microorganismos presentes en mayor cantidad el microbioma humano (modificado de Arumugam et al., 2011). ...	16
Figura 6: Fermentaciones homoláctica y heteroláctica a partir de glucosa como fuente de carbono. Modificado de Karki, 2017.	19
Figura 7: Valor del mercado norteamericano de probióticos, por aplicación, de 2012 con proyección a 2023. Los valores se encuentran en millones de USD. ■ Sector de alimentos y bebidas, ■ Sector de suplementos dietéticos, ■ Sector de alimentos para ganado (Global Markets Insights, 2017).	23
Figura 8: Segmentación de la industria global de probióticos (Global Markets Insights, 2017). ..	27
Figura 9: Diagrama para la clasificación e identificación de sustancias que se consideran prebióticas y no prebióticas (Modificado de Gibson et al., 2017).	29
Figura 10: Transición desde la a) ingeniería iterativa hasta la b) ingeniería basada en el diseño, para microorganismos de interés industrial (modificado de Tyo, Kocharin, & Nielsen, 2010).	32
Figura 11: Perfiles cinéticos descritos en sistemas fermentativos por lote: (A) exponencial, (B) logístico, (C) lineal, (D) aceleración/desaceleración (modificado de Mitchell, von Meien, Krieger, & Dalsenter, 2004).	35
Figura 12: Acercamiento rápido para mejoras operacionales y de cumplimiento (modificado de McGurk, 2004).	39

Figura 13: Selección de proyectos de mejora para la implementación de LSS (modificado de Snee, 2012).....	42
Figura 14: Diagrama ISO del sistema híbrido en cultivos continuos – lote alimentado (CCLA) para la producción de un cultivo mixto probiótico.	44
Figura 15: Diagrama de estado inicial de flujo del proceso de producción de probióticos por CCLA a escala laboratorio (0.25 L). (●) proceso de valor agregado, (■) proceso de inspección, (➔) proceso de transporte, (⊃) proceso de demora, (◆) proceso de decisión; V.A. valor agregado; P.C. proceso de control.	45
Figura 16: Diagrama de flujo del proceso de producción de probióticos por CCLA a escala piloto (7 L). (●) proceso de valor agregado, (■) proceso de inspección, (➔) proceso de transporte, (⊃) proceso de demora, (◆) proceso de decisión; V.A. valor agregado; P.C. proceso de control.	73
Figura 17: Gráfico de pastel donde se muestra la distribución ponderada de los requerimientos detectados por 77 consumidores encuestados con respecto a sus preferencias de consumo de productos probióticos. ■ impacto positivo en la salud, ■ costo accesible, ■ variedad de presentaciones de consumo, ■ variedad de puntos de venta, ■ información acerca de sus efectos, ■ vida de anaquel extendida, ■ aval por centros de investigación	74
Figura 18: Gráfico de barras donde se muestra la frecuencia acumulada de las necesidades detectadas por 77 consumidores agrupadas en 4 sectores de consumo de productos probióticos. ■ impacto positivo en la salud, ■ costo accesible, ■ variedad de presentaciones de consumo, ■ variedad de puntos de venta, ■ información acerca de sus efectos, ■ vida de anaquel extendida, ■ aval por centros de investigación	75
Figura 19: Diagrama de causa-raíz de las relaciones entre los requerimientos del cliente con los requerimientos técnicos del proceso de producción de microorganismos probióticos	76
Figura 20: Diagrama de Pareto de las relaciones entre los requerimientos técnicos del proceso de producción de microorganismos probióticos	77
Figura 21: Diagrama de Pareto de las relaciones entre las ponderaciones entre los requerimientos técnicos del proceso de producción de microorganismos probióticos en función de los requerimientos del cliente	78
Figura 22: QFD para la definición de la demanda de probióticos.	79
Figura 23: Mapeo de la cadena de valor (VSM) del proceso de producción de probióticos por CCLA para biorreactor de 7 L	81

Figura 24: Tiempo de ciclo por actividad/operador y totales de horas efectivas para el proceso de producción de probióticos por CCLA en biorreactor de 7 L. Se muestra el Takt-time (■) de 1.72 h, así como el pitch. (◆) de 12 h.	82
Figura 25: Evidencias de implementación de <u>Seiri</u> (seleccionar) para el proceso de producción de probióticos por CCLA en biorreactor de 7 L. A la izquierda se muestra el listado de componentes del biorreactor Applikon® (0.25L). A la derecha, el Biorreactor Applikon® (0.25L) con medio MBT para cultivo por lote. Debajo, Sistema de biorreactores Applikon® (0.25L, 7 L) en CCLA con medio MBT.	85
Figura 26: Lista de verificación de limpieza para el proceso de producción de probióticos por CCLA en biorreactor de 7 L.	86
Figura 27: Formato de observaciones de tiempo (en h) para el proceso de producción de probióticos por CCLA en biorreactor de 7L	87
Figura 28: Hoja de trabajo estandarizado donde se muestra la optimización de tiempos y movimientos para el proceso de producción de probióticos por CCLA para biorreactor de 7L por medio de un diagrama de espagueti del proceso. Cada color de flecha de flujo representa un operador distinto.	89
Figura 29: Hoja de combinación de trabajo estandarizado donde se muestra un análisis de brechas entre el tiempo de proceso (12.57 h), el pitch (12 h) y el Takt-time (1.71 h) para el proceso de producción de probióticos por CCLA en biorreactor de 7 L.	90
Figura 30: Tiempo de ciclo por actividad/operador y totales de horas efectivas para el proceso de producción de probióticos por CCLA en biorreactor de 7 L una vez redistribuida la carga de trabajo. Se muestra el Takt-time (■) de 1.72 h, así como el pitch. (□) de 12 h.	91
Figura 31: Project charter del proceso de producción de probióticos por CCLA a escala piloto 7 L	95
Figura 32: Análisis FODA del diseño del proceso de producción de probióticos por CCLA.	98
Figura 33: Matriz SIPOC del proceso de producción de probióticos por CCLA en biorreactor de 7 L; S: proveedores; I: entradas; P: proceso; O: salidas; C: clientes.	99
Figura 34: Diagrama CTQ de los requerimientos del cliente; CCR's: requerimientos críticos de control; CTQ's: requerimientos críticos para la calidad	100
Figura 35: Plan de colección de datos para el proceso de producción de probióticos por CCLA	102

Figura 36: Modelos de Weibull linealizados del crecimiento celular de LP (●), LR (◆) y SB (■) en medio MRS y YDP en cultivo por lote.	111
Figura 37: Crecimiento celular de LP (●), LR (◆) [eje Y2] y SB (■) [eje Y1] en medio MRS y YPD en cultivo por lote.....	116
Figura 38: Pruebas de Fischer, comparando el crecimiento (g L ⁻¹) de SB, LR y LP en medios MRS y YPD en cultivo por lote.....	117
Figura 39: Pruebas de Tukey comparando el crecimiento (g L ⁻¹) de SB, LR y LP en medios MRS y YPD en cultivo por lote.....	117
Figura 40: Consumo de sustrato (medido como glucosa) de LP, LR y SB en medio MBT.	120
Figura 41 : Consumo de compuestos fenólicos totales de LP, LR y SB en medio MBT.	123
Figura 42: Prueba de Dunnett para comparación de medias entre los cultivos continuos (CCP1, CCP2) y el cultivo por lote alimentado (LA1) para el proceso de producción de probióticos	126
Figura 43: Gráfico 3D del crecimiento de biomasa en el medio MBT.	134
Figura 44: Gráfico de contorno donde se muestra la maximización de biomasa en función de las variables significativas (fuente de carbono – g L ⁻¹ –, extracto de levadura – g L ⁻¹) con mejor deseabilidad (0.746)	135
Figura 45: Gráfico de supervivencia de LP-LR (crecidos en MRS durante 24 h de incubación a 37 °C, 0 RPM) en presencia de etanol (% v/v) a diferentes concentraciones. $\alpha = 0.5$	141
Figura 46: Gráfico de supervivencia de SB (crecido en YPD durante 24 h de incubación a 30 °C, 250 RPM) en presencia de ácido láctico (% v/v) a diferentes concentraciones. $\alpha = 0.5$	142
Figura 47: Medio MBT (fotografía de autoría propia).....	142
Figura 48: Micrografía (1000X) del cultivo de LP – LR crecidos en medio MBT (Carranza, Martínez, & Vergara, 2018).	143
Figura 49: Micrografía (1000X) del cultivo axénico de SB crecido en medio MBT (Carranza, Martínez, & Vergara, 2018).	143
Figura 50: Análisis de modo de falla (AMEF) del proceso de producción de probióticos por CCLA	147
Figura 51: Análisis de costos (MXN/kg) de medios de cultivo MRS (Sigma-Aldrich), YPD (Sigma-Aldrich) y medio MBT con tres relaciones C:N	148

AGRADECIMIENTOS

Esta Tesis se desarrolló en los laboratorios de Biotecnología e Ingeniería de Alimentos del ITESO, gracias a los fondos recabados por el Programa de Apoyo a la Investigación de ITESO, 2017. A pesar de que el proyecto involucraba a tres Departamentos y varios Programas Académicos, la Universidad destinó recursos para que yo pudiera llevar a cabo mi proyecto, por lo que en primer lugar quisiera agradecer al ITESO por permitirme lograr mis objetivos en tiempo. Espero que los resultados de esta investigación ayuden a contribuir con los programas de investigación de la universidad y fomentar el desarrollo de ciencia y tecnología en la región y en el país.

Así mismo, quisiera agradecer enormemente a mis padres y a mi hermana Karla por su incondicional apoyo durante esta etapa de mi vida. Como siempre, estuvieron a mi lado durante todo el proceso y dedico con mucho cariño esta Tesis a ustedes, que sepan que han hecho una buena inversión.

No menos importante, agradezco el apoyo de todos mis compañeros y amigos que en distinta medida apoyaron para la ejecución y realización de este trabajo: Marco Nájera, Mariana Veloz, Laura Arias, Daniel Casillas, Roberto Mora, Ana Martínez, Elisa Volquarts, Carmen Vergara, Carlos Figueredo, David Mendoza, Franklin Estrada y Alejandro Arana. Este trabajo lleva una pequeña parte de ustedes en su contenido. ¡Gracias por su apoyo!

Finalmente, agradezco a mis directores y asesores de tesis, Dr. Óscar Rojas, Dr. Pablo Hernández, Mtro. Juan Pablo Zatarain, Mtro. Ignacio Álvarez. Por el tiempo, dedicación, consejos, recomendaciones, observaciones y paciencia. El resultado es tanto suyo como mío; gracias a todos.

JUSTIFICACIÓN

En México, las enfermedades cardiovasculares y la diabetes mellitus tipo 2 se encuentran como las dos principales causas de muerte de la población a partir de los 5 años (Instituto Nacional de Estadística, Geografía e Informática [INEGI], 2017). Cuando se presentan simultáneamente varios factores de riesgo, entre los que se incluyen la presencia de diabetes, una alta presión sanguínea y niveles elevados de colesterol y glucosa en plasma se denomina síndrome metabólico, condición que aumenta la probabilidad de paro cardíaco en pacientes que la padezcan (International Diabetes Federation [IDF], 2006); la principal diferencia entre los pacientes con síndrome metabólico y aquellos con diabetes se encuentra en desviaciones de su glucemia basal en niveles superiores a 100 mg dL^{-1} , asociados frecuentemente con la prediabetes (Federación Mexicana de Diabetes [FMD], 2016). La disbiosis del microbioma intestinal inducida por dietas altas en grasas y carbohidratos se correlaciona directa y positivamente con la aparición de enfermedades no transmisibles relacionadas con el síndrome metabólico, como son la obesidad y la resistencia a la insulina, entre otras (Qin et al., 2010, Turnbaugh et al., 2006, Ott et al., 2004). Como respuesta ante este trastorno intestinal, la suplementación dietaria de microorganismos probióticos ha sido estudiada por diversos autores como una alternativa viable para combatir el síndrome metabólico en pacientes que la presenten (Delzenne, Neyrinck, Bäckhed, & Cani, 2011). A pesar de los estudios efectuados cuyos resultados han sido alentadores, el efecto de la suplementación de distintos consorcios de probióticos sobre la microbiota intestinal y su relación con la salud humana ha sido poco entendida (Wang et al., 2015). De manera adicional, resulta de particular interés el estudio y la optimización del crecimiento de estos microorganismos a nivel industrial ya que representan un nicho importante de mercado donde es posible incursionar pues la comercialización de la biomasa probiótica a nivel mundial representa un valor de mercado de más de 38 mil millones

de dólares con crecimientos sostenidos superiores al 5 % anuales (Global Market Insights [GMI], 2017) y sus aplicaciones son tan diversas que comprenden desde su uso como suplemento alimenticio hasta alimento para ganado. Son pocos los estudios que reportan lograr la optimización de las condiciones de cultivo que permitan maximizar la obtención de células viables en vez de su capacidad fermentativa (Aguirre-Ezkauriatza, Aguilar-Yáñez, Ramírez-Medrano, & Álvarez, 2010) puesto que los microorganismos probióticos requieren de medios complejos para lograr un crecimiento óptimo los cuales se caracterizan por incluir componentes como vitaminas, minerales y diversas fuentes de carbono/nitrógeno. Adicionalmente, en varios estudios recientes se ha reportado que suplementar al medio de cultivo con extractos herbales, como té verde o ajo, permiten una mayor generación de biomasa probiótica (Gutiérrez-García, 2015, Nancib et al., 2001). Bajo estas premisas, en el presente trabajo se busca estudiar el crecimiento de tres microorganismos probióticos en procesos a nivel laboratorio para optimizar sus condiciones de crecimiento y lograr niveles máximos de células viables para, posteriormente, implementar un programa *Lean-Six Sigma* de diseño para el escalamiento, estandarización y control del bioproceso a nivel piloto estableciendo una línea base productiva de 7 kg.

OBJETIVOS

Objetivo General 1

Implementar un plan *Lean-Six Sigma* para la optimización y estandarización del proceso de producción de biomasa probiótica de tres microorganismos, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus rhamnosus* y *Saccharomyces boulardii*, en un medio económicamente viable (MBT) a base de melazas de betabel, azúcar y extracto de té verde, a nivel piloto.

Objetivos Particulares 1

- Definir las etapas, indicadores y condiciones para la producción de biomasa probiótica con la finalidad de generar el diseño de un mapa de cadena de valor del proceso a nivel piloto.
- Aplicar un plan 5S para la optimización de biomasa del proceso de producción de biomasa probiótica y la generación de un procedimiento estandarizado a nivel piloto.
- Implementar un programa DMAIC de diseño, basado en estrategias *Six Sigma*, para el control del proceso de producción de biomasa probiótica a nivel piloto.

Objetivo General 2

Caracterizar las variables cinéticas de *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus rhamnosus* y *Saccharomyces boulardii* en medios de cultivo comerciales (MRS y YPD) para el diseño de un proceso utilizando un medio optimizado (MBT) a base de melazas de betabel, azúcar y extracto de té verde.

Objetivos Particulares 1

- Definir las condiciones óptimas de crecimiento para los microorganismos probióticos *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus plantarum* y *Saccharomyces boulardii* crecidos en medios comerciales (MRS y YPD) en procesos por lote.
- Caracterizar los parámetros cinéticos de crecimiento para los microorganismos probióticos *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus plantarum* y *Saccharomyces boulardii* crecidos en medios comerciales (MRS y YPD) en procesos por lote.
- Evaluar modelos estadísticos de regresión no lineal que expliquen el comportamiento del crecimiento y consumo de sustrato de los microorganismos probióticos *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus plantarum* y *Saccharomyces boulardii* en procesos por lote.
- Optimizar la producción de biomasa en un medio de cultivo análogo al medio MRS, a base de melaza de betabel y azúcar de caña, enriquecido con extracto de té verde, para maximizar la producción de biomasa microbiana probiótica.
- Evaluar el efecto de un sistema simultáneo en continuo – semicontinuo sobre el crecimiento de los microorganismos probióticos *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus plantarum* y *Saccharomyces boulardii* en medio MBT.

ALCANCES

Esta tesis se deriva del proyecto titulado “Efecto de la suplementación de simbiótico sobre la grasa corporal y marcadores de síndrome metabólico” a partir del Programa de Apoyo a la Investigación de ITESO, 2017. El proyecto original contempla múltiples actividades, sin embargo, para fines del desarrollo e investigación en esta tesis se realizaron las siguientes actividades:

1. Definir las condiciones óptimas de crecimiento (pH, oxígeno disuelto, temperatura y tiempo de fermentación) para los microorganismos probióticos *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus plantarum* y *Saccharomyces boulardii* crecidos en medios comerciales en cultivos por lote.
2. Caracterizar los parámetros cinéticos de crecimiento (t_{lag} , $\mu_{m\acute{a}x}$, K_s , $Y_{X/S}$, $Y_{P/S}$) para los microorganismos probióticos crecidos en medios comerciales y en medio optimizado en cultivos por lote.
3. Formular un medio de cultivo análogo al medio MRS, con melazas de betabel y azúcar de caña, enriquecido con extracto de té verde (*Camellia sinensis*) para la producción de biomasa probiótica por medio de diseños experimentales factoriales y de superficie de respuesta.
4. Optimizar el proceso de producción de biomasa probiótica utilizando el medio MBT en cultivos por lote, continuo y semi-continuo.
5. Implementar un plan *Lean* para definir las etapas, indicadores y condiciones más adecuados para la producción de biomasa probiótica y poder generar el diseño de un mapa de cadena de valor del proceso a nivel piloto.

6. Aplicar un plan 5S para la optimización del proceso de producción de biomasa y generar un procedimiento estandarizado a nivel piloto.
7. Implementar un programa DMAIC de diseño, basado en estrategias *Six Sigma*, para el control del proceso de producción de biomasa probiótica a nivel piloto.

ÍNDICE DE SIGLAS Y ABREVIATURAS

- **AR:** Azúcares reductores.
- **AT:** Azúcares totales.
- **BI:** Bondad de ajuste.
- **CFT:** Compuestos fenólicos totales.
- **CCLA:** Cultivo mixto continuo – lote alimentado.
- **DMT2:** Diabetes Mellitus tipo 2.
- **DO:** Densidad óptica.
- **DoE:** Diseño de experimentos.
- **ENT:** Enfermedades no transmisibles.
- **ETV:** Extracto de té verde.
- **g:** Gramos.
- **HOQ:** Matriz de casa de calidad.
- **IC:** Intervalos de confianza.
- **IMC:** Índice de masa corporal.
- **KPI:** Elementos clave de desempeño.
- **Ks:** constante de saturación.
- **L:** Litros.
- **Lp:** *Lactobacillus plantarum*.
- **Lr:** *Lactobacillus rhamnosus*.
- **LSS:** *Lean – Six Sigma*.
- **mg:** Miligramos.
- **MetS:** Síndrome metabólico.
- **mM:** Milimolar.
- **MBT:** Medio optimizado con melaza de betabel y azúcar de caña.
- **MRS:** Medio de Man, Rogosa y Sharpe.
- **PS:** Peso seco.
- **QbD:** Calidad desde el diseño.
- **QFD:** Despliegue de función de calidad.
- **R²:** Coeficiente de determinación.
- **RI:** Resistencia a la insulina.
- **RM:** Reactor de mantenimiento.
- **RP:** Reactor de propagación.
- **Sb:** *Saccharomyces boulardii*.
- **t_{lag}:** Tiempo observado de mantenimiento.
- **UFC:** Unidades formadoras de colonias.
- **VSM:** Mapeo de la cadena de valor.

➤ **$Y_{x/s}$** : Rendimiento global biomasa /
substrato.

➤ **$Y_{p/s}$** : Rendimiento global producto /
substrato.

➤ **μg** : Microgramos.

➤ **$\mu_{m\acute{a}x}$** : Velocidad específica de
crecimiento.

CAPÍTULO I
SÍNDROME METABÓLICO

1. ENFERMEDADES NO TRANSMISIBLES

1.1.Situación Mundial

Las enfermedades no transmisibles también denominadas enfermedades crónicas, son un conjunto de condiciones de larga duración con efectos adversos a la salud que surgen como resultado de diversos factores genéticos, ambientales, fisiológicos o comportamentales. Las principales ENT comprenden problemas cardiovasculares, cáncer, enfermedades respiratorias crónicas y diabetes; de todas ellas, las enfermedades cardiovasculares resultan en la muerte de 17.7 millones de personas anualmente, mientras que la diabetes en 1.6 millones de decesos (Organización Mundial de la Salud [OMS], 2017) y más del 80 % de estas muertes ocurren en países en desarrollo.

A nivel mundial, desde 1990 a 2015, el riesgo de muerte y los años de vida saludable ajustados por discapacidad (DALYs por sus siglas en inglés) asociados con las ENT se han visto incrementados de manera significativa, particularmente debido a factores comportamentales y factores metabólicos de riesgo (GBD 2015 Risk Factors Collaborators, 2016). Los factores comportamentales son malos hábitos de las personas que resultan en efectos perjudiciales a la salud, entre los que se pueden destacar el tabaquismo, inactividad física y una dieta desbalanceada, así como el abuso en el consumo de alcohol, los cuales han contribuido al aumento de riesgo de contraer una ENT y se han visto progresivamente incrementados en los últimos 30 años (OMS, 2017). Estos malos hábitos pueden resultar en el cambio de uno o varios parámetros metabólicos; cuatro de ellos son atribuibles a más del 19 % de las muertes asociadas por ENT: presentar una elevada presión sanguínea, obesidad, hiperglicemia y, finalmente, hipoglicemia (OMS, 2017).

1.2. Situación en México

En México, la situación es similar a la presentada a nivel mundial. Las ENT, particularmente las enfermedades cardiovasculares y la diabetes mellitus tipo 2, se encuentran como las dos principales causas de muerte de la población a partir de los 5 años (INEGI, 2017) y en conjunto dominan el panorama de la mortalidad entre los adultos mayores de 40 años y se consideran como los principales factores de riesgo a los cambios de los hábitos alimentarios, al menor gasto de energía asociado a estilos de vida sedentarios, al tabaquismo y al consumo de alcohol (Dirección General de Evaluación del Desempeño [DGED], 2015); en conjunto, todas las ENT han representado desde 1990 más del 60% de DALYs perdidos, con un incremento a valores cercanos a 76.6 % en 2015 de acuerdo con el Instituto para la Evaluación y Métricas de la Salud (IHME por sus siglas en inglés), tal como se puede apreciar en la figura 1.

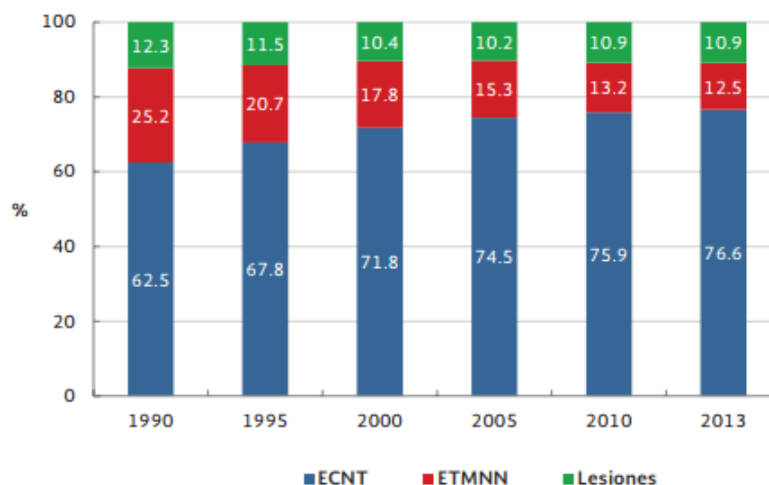


Figura 1 Porcentaje de DALYs perdidos por agrupaciones de causas desde 1990 hasta 2013. ECNT: Enfermedades crónicas no transmisibles. ETMNN: Enfermedades transmisibles, maternas, neonatales y de la nutrición. (DGED, 2015).

1.3. Programas de prevención y administración de las enfermedades no transmisibles

Existen distintos programas a nivel internacional y nacional para la prevención de ENT. Internacionalmente, la OMS se encuentra a la vanguardia de prevención de ENT con el objetivo de prevenir muertes relacionadas con estas enfermedades. La Organización cuenta con cuatro iniciativas principalmente (OMS, 2017):

➤ **Iniciativa “Libre de tabaco” (TFI por sus siglas en inglés):**

Esta iniciativa se encuentra activa desde 1998 y se basa en centrar la atención, recursos y acciones globales para reducir esta epidemia. Ésta cuenta con tres ejes de acción: el primero de ellos – economía de control del tabaco – tiene como objetivo demostrar que las políticas de regulación de tabaco (como los impuestos a su consumo) tienen sentido económico. El segundo eje de acción se centra en la capacidad nacional de construcción de estrategias para resistir la epidemia del tabaco y reducir su demanda. Finalmente, el tercer eje de acción involucra la creación y mejor de sistemas de información detallados cuyo objetivo se centra en mejorar la disponibilidad de datos de monitoreo de uso de tabaco, su exposición y efectos sobre la salud.

➤ **Promoción de la salud**

Esta iniciativa se basa en promover las acciones entre sectores de la salud, la reducción de riesgos a la salud y la promoción de estilos de vida saludable. Cuenta con dos programas: Salud oral y Escuela de la salud, los cuales buscan prevenir, controlar y fomentar acciones que resulten en la prevención de ENT.

➤ Vigilancia y prevención poblacional

La iniciativa se centra en coordinar y proveer dirección y apoyo técnico y administrativo que resulte en acciones a nivel poblacional, las cuales van desde políticas públicas a intervenciones ambientales. Entre las acciones que desarrollan se encuentran promover la actividad física, reducción en el consumo de sal, generación de recomendaciones de marketing para alimentos y bebidas infantiles y desarrollo de políticas fiscales dietarias.

➤ Programa “mHealth” o “salud móvil”

La iniciativa se basa en el uso de tecnologías móviles para promover cambios comportamentales saludables en la población, por medio de la proveeduría de herramientas y soporte técnico a aquellos países matriculados en el programa.

La OMS no sólo se encarga de la prevención de las ENT si no que busca desarrollar inversiones que resulten en una mejor administración de éstas. La administración de ENT se refiere a la detección, delimitación y tratamiento de ENT, así como el cuidado paliativo de pacientes que presenten alguna enfermedad; esto lo desarrolla por medio del programa denominado Paquete Esencial de Intervenciones de ENT para cuidados primarios a la salud (PEN por sus siglas en inglés). Este Paquete es un marco de referencia para fortalecer la equidad y eficiencia de servicios primarios de salud en ambientes de bajos recursos, el cual es capaz de identificar tecnologías centrales, medicamentos y herramientas de predicción, incluidos los protocolos requeridos para la administración de los cuatro grupos principales de ENT, como se muestra en la figura 2 (OMS, 2010).



Figura 2: Paquete Esencial de Intervenciones de ENT para cuidados primarios a la salud (modificado de Package of essential noncommunicable (PEN) disease interventions for primary health care in low-resource settings, 2010).

A nivel nacional, la Secretaría de Salud ha establecido como objetivo “Reducir la carga de morbilidad y mortalidad de enfermedades crónicas no transmisibles, principalmente diabetes e hipertensión”, las cuales son agrupadas como enfermedades relacionadas con el síndrome metabólico (SM), dentro del Plan Nacional de Desarrollo 2013 – 2018, en su estrategia 2.3.2 con línea de acción “Hacer de las acciones de protección, promoción y prevención un eje prioritario para el mejoramiento de la salud”. Para controlar y prevenir estas enfermedades se creó un programa de “Estrategia Nacional para la Prevención y Control del Sobrepeso, la Obesidad y la Diabetes” el cual contempla 3 ejes (Observatorio Mexicano de Enfermedades No Transmisibles [OMENT], 2013):

➤ Salud Pública

Este eje busca preservar la salud pública al promover estilos de vida saludable por medio de campañas educativas y monitoreando las tendencias de las ENT.

➤ Cuidado Médico

Este eje pretende garantizar el acceso a servicios de salud a través de intervenciones médicas dirigidas a personas con factores de riesgo al mismo tiempo que se proporciona un cuidado constante y evitando complicaciones derivadas de las ENT. Para ello, se establecen en esta estrategia los requerimientos para el funcionamiento de los servicios de salud, así como el uso de las tecnologías disponibles que faciliten el acceso a las unidades de salud. Finalmente, también propone acciones para capacitación de personal de salud al igual que la promoción de la investigación y generación de evidencias científicas.

➤ Regulaciones de Salud y Política Fiscal

En este último eje se establecieron regulaciones en la publicidad, particularmente dirigida a niños, así como políticas fiscales cuyo fin fuera reducir el consumo de alimentos con valores calóricos altos.

A partir del desarrollo de la estrategia se han derivaron medidas regulatorias como el etiquetado frontal de alimentos y un impuesto especial (IEPS) a alimentos y bebidas con altos niveles de azúcar, así como campañas de concientización como “Chécate, mídete, muévete” que tiene que ver con que los pacientes asistan a sus clínicas de salud para conocer su peso, medir su circunferencia de cintura, disminuir el consumo de grasas, azúcares y sal en sus comidas y realizar ejercicio cotidianamente (Secretaría de Salud, 2016).

1.4. Enfermedades no transmisibles relacionadas con el síndrome metabólico

1.4.1. Obesidad y sobrepeso

Tanto la obesidad como el sobrepeso se pueden definir como acumulaciones anormales o excesivas de grasa que pueden causar riesgos a la salud (OMS, 2017). La OMS clasifica estos desórdenes corporales con base en el índice de masa corporal – un índice que relaciona el peso para la talla— donde valores mayores o iguales a 25 indican sobrepeso, mientras que valores superiores o iguales a 30, obesidad (OMS, 2017). Se estima que en 2016 el 39 % de adultos a nivel mundial presentaban sobrepeso (alrededor de 1.9 mil millones de personas) mientras que el 13% de la población mundial presentaban obesidad (alrededor de 650 millones de personas); por otro lado, se estima que en México el 72.5 % de la población presentaba algún tipo de problema de exceso de peso (Secretaría de Salud [SS], 2016).

Existen estudios que relacionan la obesidad como uno de los principales causantes de la resistencia a la insulina (Dandona, Aljada, & Bandyopadhyay, 2004); este desorden metabólico se puede ver aún más afectado por otras ENT como la hipertensión y dislipidemia, las cuales son precursoras de la diabetes mellitus tipo 2 (DMT2) como se muestra en la figura 3 (Badawi et al., 2010).

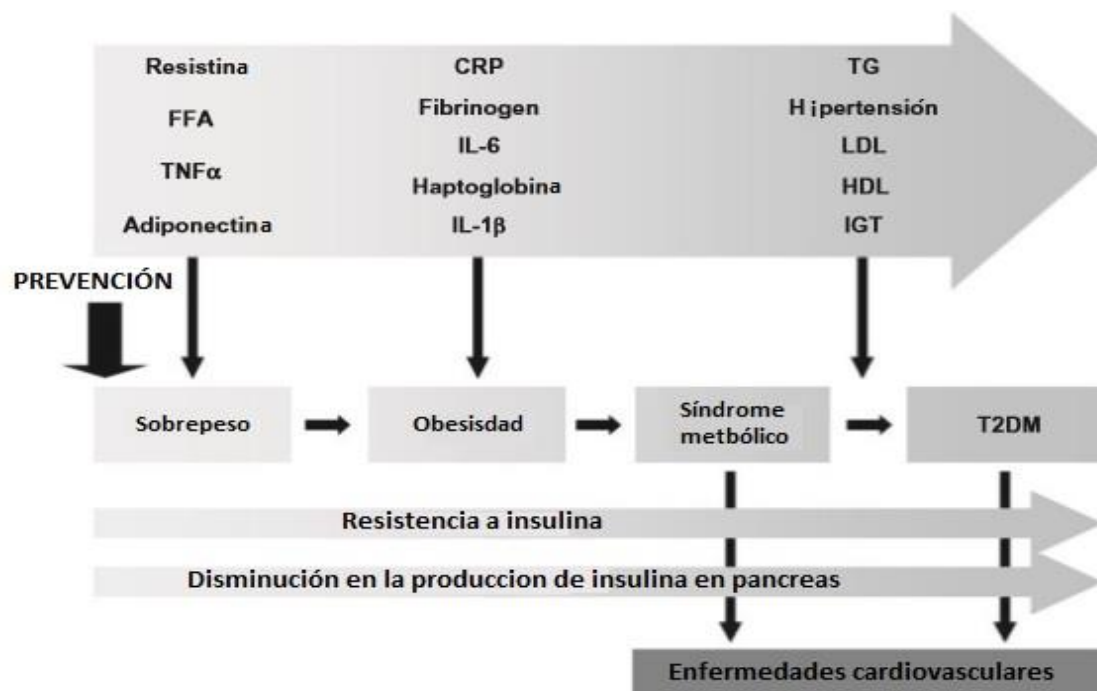


Figura 3: Relación entre marcadores inflamatorios y factores de enfermedades específicas en las distintas etapas patológicas desde el sobrepeso hasta la DM2 y enfermedades cardiovasculares (modificado de Badawi et al., 2010).

1.4.2. Diabetes Mellitus

Se denomina “diabetes” a un grupo de enfermedades metabólicas caracterizadas por hiperglicemia resultante de deficiencias en la excreción de la hormona insulina o por una acción deficiente de ésta (American Diabetes Association [ADA], 2013); varios procesos patogénicos están relacionados con el desarrollo de la enfermedad, los cuales abarcan desde la destrucción autoinmune de las células β pancreáticas – resultando en deficiencias en la producción de insulina – hasta anormalidades metabólicas que resultan en RI.

La gran mayoría de los diagnósticos de diabetes se engloban en dos amplias categorías. La primera de ellas, denominada diabetes tipo I o diabetes insulina-dependiente, es causada por una deficiente excreción de insulina debido a procesos patológicos autoinmunes en las isletas de

Langerhans pancreáticas. La segunda, denominada diabetes tipo II o insulina-independiente, es la más prevalente entre los pacientes diagnosticados con la enfermedad. Este tipo de diabetes es ocasionado por una combinación de resistencia a la insulina, así como por una inadecuada secreción de la hormona (Federación Mexicana de Diabetes [FMD], 2016). La principal diferencia entre los pacientes con síndrome metabólico y aquellos con diabetes se encuentra en los niveles de glucosa sanguínea que se encuentran en rangos de 100 a 125 mg dL⁻¹, niveles asociados frecuentemente con la prediabetes (FMD, 2016).

1.4.3. Resistencia a la insulina

Los niveles de glucosa en sangre se encuentran – en condiciones basales en personas en ayuno, cercanos a concentraciones de entre 5.0 y 5.4 mM, es decir, entre 60 y 110 mg dL⁻¹; estos niveles se logran por medio de la acción combinada de cuatro hormonas: insulina, glucagón, epinefrina y cortisol (OMS, 2006). Cuando los niveles de glucosa en sangre sobrepasan concentraciones de 6.0 mM, se considera que existe una respuesta tardía de la insulina, la cual está relacionada con la pérdida de funcionalidad de las células β del páncreas. A esta respuesta tardía en la regulación de glucosa en sangre se le considera como “resistencia a la insulina” (OMS, 2006). La RI no es un diagnóstico clínico pues en muchos casos, manteniendo cuidados en la dieta y hábitos de la persona que se encuentra en esta condición, es reversible; por ello, más bien se le considera como un estado de riesgo que puede desencadenar en DMT2. De acuerdo con datos de la OMS (2006), cerca del 33 % a 48 % de la población mundial presenta RI, de los cuales del 6 % al 13 % desarrollan DMT2.

1.4.4. Procesos bioquímicos relacionados con el SM y la RI

Después de cada comida, los alimentos ricos en macromoléculas son degradados hasta moléculas más sencillas. Particularmente, en el caso de los carbohidratos, estos se metabolizan por medio de una serie de reacciones enzimáticas a lo largo de la ruta metabólica del carbono central hasta la formación de glucosa, la cual tiene la capacidad de viajar por el torrente sanguíneo hasta llegar a los órganos o tejidos que la requieran como fuente de energía (Nelson & Cox, 2013). La insulina, una hormona de naturaleza proteica, se sintetiza en el páncreas donde es almacenada en su forma no reactiva – proinsulina – en las células β de este órgano. Cuando los niveles de glucosa en sangre son elevados, la proinsulina es secretada y activada por acción enzimática, generando así una molécula señalizadora que provoca que los órganos o tejidos metabolicen el exceso de glucosa en glucosa 6-fosfato (Nelson & Cox, 2013). Al mismo tiempo que se activa la enzima glucógeno sintasa, se inactiva la glucosa fosforilasa, lo cual provoca que la glucosa-6-fosfato se transforme en glucógeno o triglicéridos para su almacenamiento (Nelson & Cox, 2013).

Una alta interacción de lípidos ectópicos (ácidos grasos y triglicéridos) con tejidos musculares puede generar procesos inflamatorios los cuales resultan en la aparición de RI (Samuel & Shulman, 2012). Como se puede apreciar en la figura #, los ácidos grasos (AG) pueden ser introducidos a través de la membrana celular por las proteínas intramembranales TLR4. Una interacción entre los AG-TLR4 promueve una cascada de señales entre el gen de respuesta primaria de diferenciación de mieloides (MYD88), el receptor de interlucina quinasa 1 (IRAK1) y el factor de asociación del receptor TNF (TRAF 6) que provocan la acción de las quinasas activadas por mitógenos (MAPK) las cuales llevan a cabo la fosforilación del inhibidor de $\text{NF}\kappa\text{B}$ quinasa- β (IKK), la cual actúa como una proteína precursora de las moléculas proinflamatorias $\text{TNF}\alpha$, IL-6, IL-1 β (Samuel & Shulman, 2012). Por su parte, JNK fosforila a la proteína activadora 1 (AP-1)

que da lugar a producción de las mismas moléculas proinflamatorias activadas por NFκB (Badawi et al., 2010).

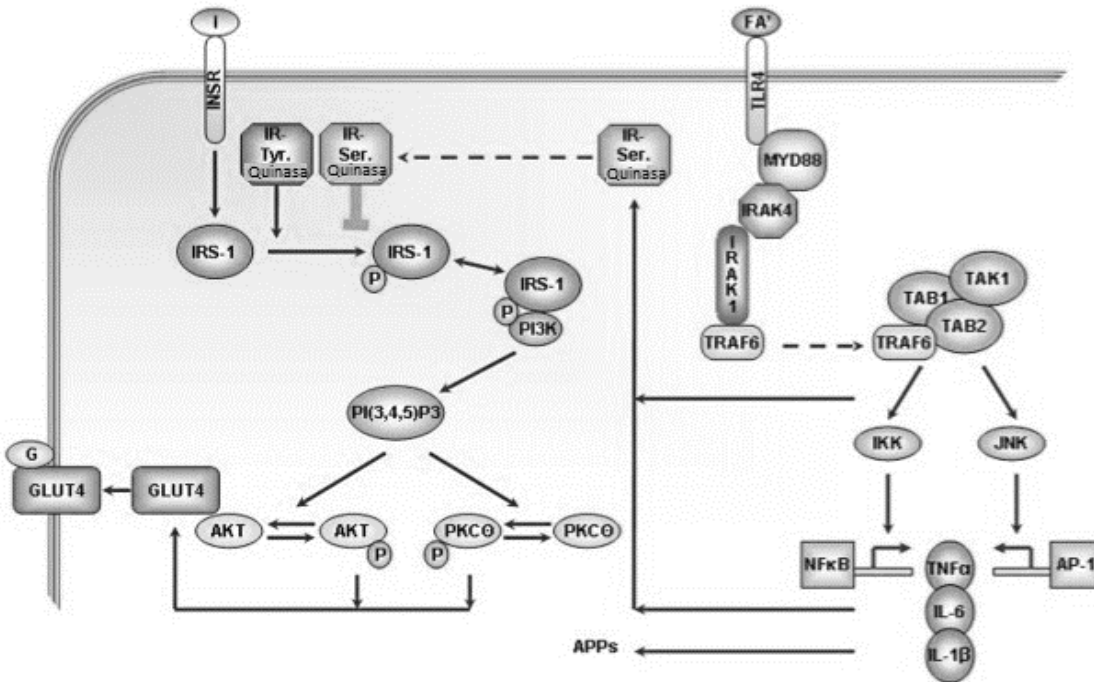


Figura 4: Interacciones entre la insulina y ácidos grasos en la síntesis de moléculas proinflamatorias (modificado de Badawi et al., 2010).

Independientemente del tamaño de cadena del AG precursor, las proteínas proinflamatorias interactúan con las quinasas receptoras de insulina dependientes de serina (IRSK), inhibiendo la acción de las quinasas receptoras de insulina dependientes de tirosina (IRYK) propiciando la RI.

CAPÍTULO II
PROBIÓTICOS Y PREBIÓTICOS

1. MICROBIOMA HUMANO

El tracto intestinal humano es una matriz compleja donde interactúan simultáneamente las células del huésped, nutrientes y que, además, se encuentra naturalmente colonizado por más de 400 especies de bacterias correspondiente a más de la mitad del peso húmedo del material colorrectal (FAO, 2006), es decir, concentraciones en colon de aproximadamente 10^{12} bacterias/g; La colonización de estos microorganismos – llamados comúnmente microbiota o microbioma – inicia desde el nacimiento y continúa durante el resto de la vida de un ser humano y no suelen presentar efectos adversos a la salud. Nuestro “metagenoma” – es decir, la mezcla de genes humanos y microbianos – se ve compuesto en su mayoría por aquellos provenientes de estos últimos, los cuales tienen funciones metabólicas que como especie no hemos sido capaces de desarrollar (Turnbaugh et al., 2006) como son funciones de degradación de algunos componentes de nuestra dieta (como polisacáridos y algunos AG de cadena corta), protección de las células epiteliales, regulación del sistema de transporte de grasas, y estimulación de la angiogénesis intestinal, entre otras (Eckburg et al., 2005). Este metagenoma está compuesto en más del 90 % por dos grandes familias de bacterias benéficas, los Bacteroidetes y los Firmicutes (Arumugam et al., 2006) como se aprecia en la figura 5.

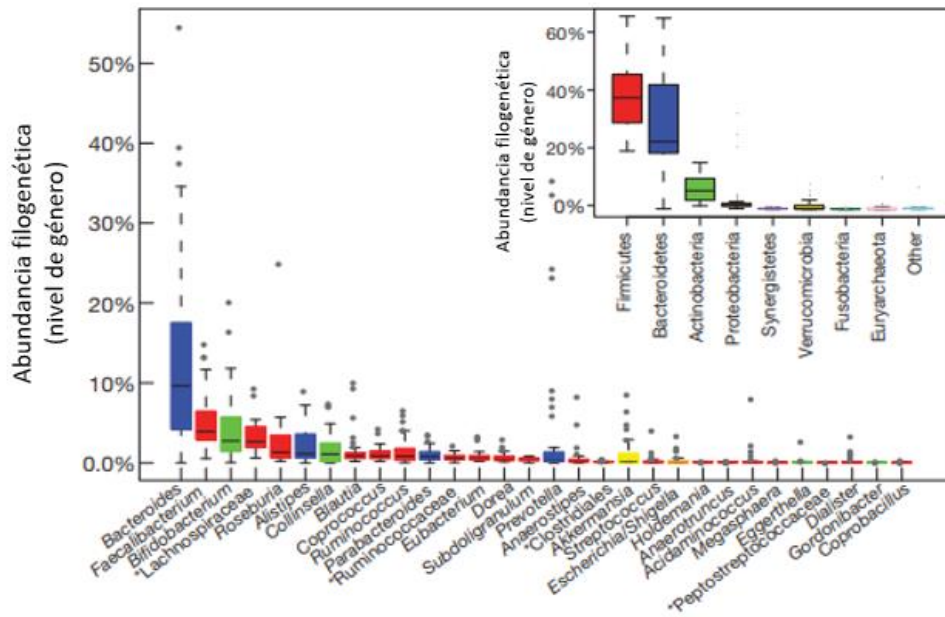


Figura 5: Gráfico de caja de la variación en la abundancia de género de los 30 microorganismos presentes en mayor cantidad el microbioma humano (modificado de Arumugam et al., 2011).

Los Firmicutes son microorganismos aeróbicos facultativos, también conocidos como bacterias ácido-lácticas, los cuales incluyen a bacterias de los géneros *Prevotella*, *Lactobacillus*, *Enterococcus* y *Clostridium*, principalmente (Voreades, Kozil, & Weir, 2014); en cambio, los Bacteroidetes son microorganismos anaeróbicos, los cuales comprenden a los géneros *Bacteroides* y *Parabacteroides*, principalmente (Voreades, Kozil, & Weir, 2014)

Existen varios estudios donde se ha observado que la composición del microbioma se ve alterada entre individuos delgados e individuos con sobrepeso u obesidad, aumentando la proporción de bacteroidetes conforme disminuye el peso de una persona (Eckburg et al., 2005, Ley et al., 2006, Turnbaugh et al., 2006); como una alternativa de tratamiento ante esta enfermedad se ha propuesto el consumo (de manera oral) de microorganismos probióticos en la dieta de personas

con ENT relacionadas con el síndrome metabólico buscando su proliferación y adherencia en el intestino con el fin de regular la disbiosis del microbioma del paciente.

2. PROBIÓTICOS

2.1. Definición

Desde su descubrimiento a principios del siglo XX por Elie Metchnikoff, se ha propuesto que el consumo de estos microorganismos podría resultar en un beneficio a la salud – de ahí el término “probiótico” o, en otras palabras, “a favor de la vida”. Los probióticos son “microorganismos vivos que al ser consumidos en cantidades adecuadas pueden conferir un efecto benéfico en el huésped” (FAO, 2006) y para poder ser definidos como probióticos estos microorganismos no sólo deben de ser capaces de sobrevivir el paso por el tracto digestivo de una persona que los ingiera, sino que deben de proliferar en los intestinos (FAO, 2006); para ello, es necesario que las concentraciones de ingesta de los microorganismos probióticos no sean inferiores a 10^6 UFC mL⁻¹ antes de su fecha de caducidad, ya que se ha sugerido que la mínima dosis terapéutica (diaria) debe de ser en concentraciones entre 10^8 y 10^9 células (Kailasapathy & Chin, 2000).

Cada vez son más numerosos los estudios realizados con distintos géneros y especies de microorganismos, como *Bifidobacterium*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Bacteroides* y *Streptococcus*, entre otros, en donde se les han atribuido efectos probióticos al interactuar en el tracto digestivo humano (Wang et al., 2015); a la mayoría de estos microorganismos se les cataloga como bacterias ácido-lácticas debido a que han sido aislados de productos lácteos fermentados, tales como el kéfir, leche Maasai o Kurut (Butel, 2014), aunque existen otros que han sido aislados de fuentes no lácteas, como alimentos no fermentados (carne, embutidos o vegetales) o del mismo tracto intestinal de otros seres vivos.

2.2. Clasificación biológica

Las bacterias ácido-lácticas comprenden a un conjunto de microorganismos de alrededor de 20 géneros y especies distintos (principalmente *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus* y *Streptococcus*), con ciertas características en común: son bacterias gram-positivas, no-esporuladas, catalasa-negativas, anaerobias pero aerotolerantes, sin presencia de citocromos, ácido-tolerantes, en forma de cocos o bacilos, con temperaturas y valores de pH óptimos de crecimiento entre los 30 y 37 °C y entre 6.5 y 7.0, respectivamente; además, presentan características metabólicas no-respiratorias y estrictamente fermentativas las cuales producen principalmente ácido láctico como aceptor final de electrones en el metabolismo de carbohidratos (Axelsson, 2004, Song, Ibrahim & Hayek, 2012) por medio de alguna de dos rutas metabólicas, como se aprecia en la figura 6:

- Metabolismo homoláctico: comprende la glicólisis, es decir, la degradación de glucosa hasta la formación de ácido pirúvico y, posteriormente, su reducción para la formación del ácido láctico.

- Metabolismo heteroláctico: por medio de la ruta del 6-fosfogluconato/fosfocetolasa, en la cual la glucosa es oxidada hasta ácido láctico, pero, adicionalmente, se generan otras sustancias como etanol, acetato y CO₂.

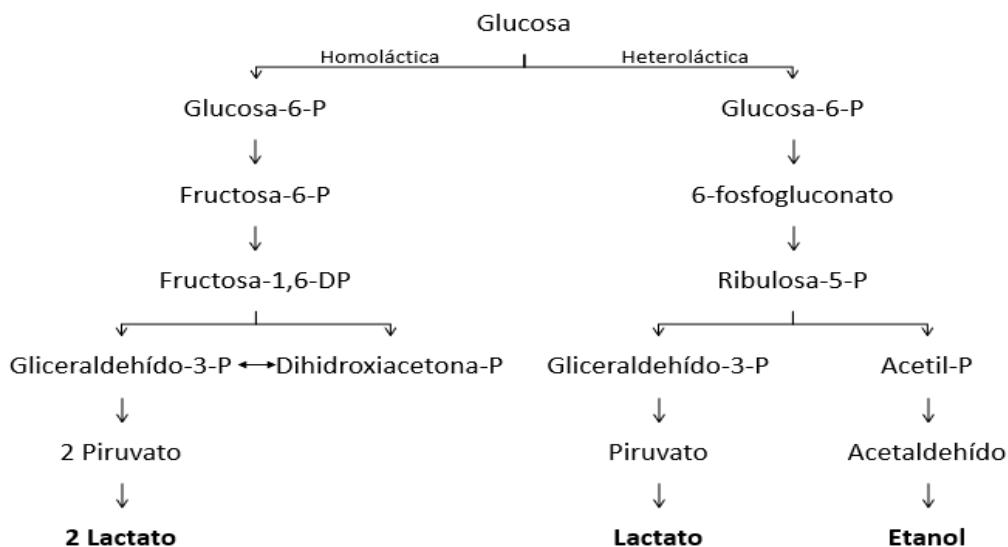


Figura 6: Fermentaciones homoláctica y heteroláctica a partir de glucosa como fuente de carbono. Modificado de Karki, 2017.

Adicionalmente, las bacterias ácido-lácticas poseen capacidades limitadas para sintetizar aminoácidos a partir de fuentes de nitrógeno limitadas (Axelsson, 2004), lo que las vuelve dependientes de la concentración de éstos en el medio de cultivo y su crecimiento en medios mínimos minerales suele ser, regularmente, muy lento, prefiriendo medios ricos para aprovechar al máximo los nutrientes presentes en ellos. Muchos de estos microorganismos, además, poseen la capacidad de sintetizar enzimas proteolíticas (serin-proteinasas extracelulares ancladas-a-membrana) así como una gran variedad de peptidasas intracelulares (Axelsson, 2004).

2.3. Estudios previos relacionados con efectos benéficos sobre el MetS

De acuerdo con la Sociedad Europea de Neurogastroenterología y Motilidad (SENM, 2015), la disbiosis “También denominada disbacteriosis, hace referencia a un desequilibrio en el número o tipo de colonias microbianas que han colonizado al hombre. Se da más en el tracto digestivo (...)”

puede afectar a la digestión, absorción de nutrientes, producción de vitaminas y control de microorganismos dañinos.”

Existe evidencia que disbiosis de la microbiota intestinal inducida por dietas altas en grasas y carbohidratos se correlacionan directa y positivamente con la aparición de ENT relacionadas con el síndrome metabólico, como son la obesidad y la RI, entre otras (Qin et al., 2010, Turnbaugh et al., 2006, Ott et al., 2004). Como respuesta ante este trastorno intestinal, la suplementación dietaria de microorganismos probióticos ha sido estudiada por diversos autores como una alternativa viable para combatir el MetS en pacientes que la presenten (Delzenne, Neyrinck, Bäckhed, & Cani, 2011).

A pesar de los estudios efectuados cuyos resultados han sido alentadores, el efecto de la suplementación de distintos consorcios de probióticos sobre la microbiota intestinal y su relación con la salud humana ha sido poco entendida (Wang et al., 2015). Estrictamente hablando, no se conoce el mecanismo de acción de los probióticos, sin embargo, se cree que los efectos benéficos de estos organismos sobre la salud inician con la modulación de la microbiota del huésped por medio de un mecanismo de “barrera” la cual genera un efecto de resistencia a la colonización del tracto intestinal por especies patógenas (Butel, 2014). Esta “barrera” inhibitoria podría estar formada por metabolitos con efecto inhibidor generados por los probióticos, como bactericinas, biosurfactantes o ácidos grasos de cadena corta capaces de disminuir el pH del medio desfavoreciendo así las condiciones de crecimiento de los patógenos (Butel, 2014); así mismo, el mecanismo de “barrera” podría desarrollarse como competencia por sitios activos o por inhibición a la adhesión a las mucosas intestinales.

Existe mucha información bibliográfica donde se han reportado los efectos benéficos atribuibles a los probióticos sobre la salud humana. Algunos de los estudios donde se han mostrado resultados favorables a partir de la suplementación de microorganismos probióticos sobre humanos que presentan ENT relacionadas con el MetS se muestran en el cuadro 1.

Cuadro 1: Trabajos previos relacionados con la suplementación de probióticos como tratamiento al MetS y ENT, con resultados positivos para humanos, agrupados por familia microbiana.

No.	Referencia	Microorganismo empleado	Dosis empleada	Tipo de Estudio
I. FIRMICUTES				
1	Karlsson-	<i>Lactobacillus</i>		Estudio con un grupo control (62
	Videhult et al., 2015	<i>paracasei</i> ssp. <i>Paracasei</i> F19	1×10^8 UFC día ⁻¹	infantes) y un grupo problema (58 infantes) entre 4 y 13 meses.
2	Gobel et al., 2012	<i>Lactobacillus salivarius</i> Ls-33	1×10^{10} UFC día ⁻¹	Estudio con un grupo control (23 adolescentes) y un grupo problema (27 adolescentes con IMC > 30) entre 12 y 15 años.
	Kadooka et al., 2010	<i>Lactobacillus gasseri</i> SBT2055	5×10^{10} UFC día ⁻¹	Estudio con un grupo control (44 adultos con IMC < 25) y un grupo problema (43 adultos con $25 < \text{IMC} < 30$) mayores de 18 años.

4	Luoto et al., 2010	<i>Lactobacillus</i> <i>rhamnosus</i> GG, ATCC 53103	1×10^{10} UFC día ⁻¹	Estudio con un grupo control (82 infantes) y un grupo problema (77 infantes) desde 4 semanas antes del nacimiento hasta los 7 años.
5	West et al., 2007	<i>Lactobacillus</i> <i>paracasei</i> ssp. <i>Paracasei</i> F19	1×10^8 UFC día ⁻¹	Estudio con un grupo control (89 infantes) y un grupo problema (90 infantes) entre 4 y 13 meses.

II. ACTINOMICETES

1	Rajkumar et al., 2014	Mezcla de <i>Bifidobacterium</i> , <i>Streptococcus</i> y <i>Lactobacillus</i>	1×10^{11} UFC día ⁻¹	Estudio con un grupo control (30 adultos) y un grupo problema (30 adultos) de entre 40 y 60 años con IMC > 25.
2	Asemi et al., 2013	Mezcla de <i>Bifidobacterium</i> , <i>Streptococcus</i> y <i>Lactobacillus</i>	$2 \times 10^8 - 2 \times 10^8$ UFC día ⁻¹	Estudio con un grupo control (27 adultos) y un grupo problema (27 adultos) de entre 35 y 70 años.
3	Million et al., 2012	Mezcla de <i>Bifidobacterium</i> y <i>Lactobacillus</i>	1×10^{10} UFC día ⁻¹	Estudio con un grupo control (47 adultos con $19 < \text{IMC} < 25$) y un grupo problema (68 adultos con IMC > 30) mayores de 18 años.
4	Malaguarnera et al., 2012	<i>Bifidobacterium</i> <i>longum</i>	2.5 g / dosis	Estudio con un grupo control (32 adultos) y un grupo problema (34

5

			adultos) de entre 25 y 30 años con IMC < 30.
	Mezcla de <i>Lactobacillus</i> <i>acidophilus</i> y <i>Bifidobacterium</i> <i>lactis</i>	<i>L. acidophilus</i> : 7x10 ⁶ UFC día ⁻¹ <i>B. lactis</i> : 6x10 ⁶ UFC día ⁻¹	Estudio doble ciego con un grupo control (32 adultos) y un grupo problema (32 adultos) de entre 30 y 60 años con IMC < 35.
Ejtahed et al., 2011			

2.4. Aplicaciones y situación del mercado mundial de probióticos

Los probióticos no sólo representan una estrategia viable para el combate de enfermedades, sino también un nicho interesante de mercado, tanto a nivel local como global. En la figura 7 se muestra el valor de mercado de probióticos en Norteamérica, de 2012 a 2016, con proyección hasta 2023; como se aprecia en la figura, se ha observado un crecimiento sostenido en los últimos años de 10.7 % anual, reportando valores de mercado superiores a los 3,500 millones de dólares en 2016 (GMI, 2017).

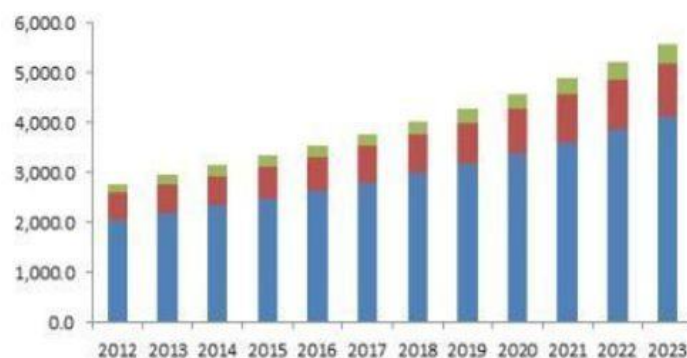


Figura 7: Valor del mercado norteamericano de probióticos, por aplicación, de 2012 con proyección a 2023. Los valores se encuentran en millones de USD. ■ Sector de alimentos y bebidas, ■ Sector de suplementos dietéticos, ■ Sector de alimentos para ganado (Global Markets Insights, 2017).

El motivo de este incremento es debido a cinco factores, principalmente (GMI, 2017):

- Aumento en la concientización en temas de calidad y cambios en las preferencias de los consumidores por adquirir productos más “saludables”, principalmente en los sectores geriátrico y como una alternativa para combatir enfermedades o afecciones de salud.
- Gran potencial de aplicaciones en distintos tipos de productos, con fines de alimentación humana y animal.
- Aumento en los controles de calidad de los alimentos destinados a animales, con motivo de reducir sus enfermedades y mejorar su salud.
- Apuesta por varias corporaciones internacionales (Nestlé®, Yakult®, entre otras) de invertir en este mercado, principalmente en la región de Asia-Pacífico.
- Mejoras en la normatividad y regulaciones regionales, favoreciendo el uso y comercialización de probióticos.

Existe una gran variedad de usos para los probióticos, que comprenden su uso y aplicación en productos destinados para la alimentación humana y la animal. En la figura 8 se aprecia los principales segmentos de los sectores donde se destina el uso de probióticos (GMI, 2017), siendo el principal actor el mercado de alimentos y bebidas (representando el 74 % del valor de mercado de probióticos), seguido del de suplementos dietarios (19.5 % del valor de mercado) y, finalmente, del de alimentación animal (6.5 % del valor de mercado).

Dentro del mercado de alimentos y bebidas, la mayoría de los probióticos se utilizan en productos lácteos, pero también han sido utilizados en otro tipo de productos no lácteos como

productos a base de frutas o verduras, cereales, cárnicos, alimentos secos, algunos productos horneados, entre otros (Song, Ibrahim, & Hayek, 2012).

- Productos lácteos: son los principales utilizados como vehículo de probióticos, que abarcan desde quesos, leches frescas o acidificadas, yogures, cremas, helados, mousses, kéfir, entre otros, ya que estos suelen conservarse en refrigeración permitiendo extender la viabilidad de los microorganismos en el producto. Los microorganismos más utilizados en este tipo de productos comprenden a *Lactobacillus rhamnosus*, principalmente, pero se han utilizado otros tipos de organismos como *L. casei*, *L. paracasei*, *L. acidophilus*, *L. reuteri*, *L. plantarum*, *L. delbrueckii*, *L. bulgaricus*, especies de *Bifidobacterium* y algunos *Streptococcus*.
- Productos no lácteos a base de frutas o verduras: suelen presentar problemas para el crecimiento de los probióticos debido a sus condiciones de almacenamiento. Entre sus formas de comercialización, los más usuales son bebidas o jugos, frutas secas, purés y algunos alimentos fermentados. Los microorganismos más utilizados en este tipo de productos comprenden a *Lactobacillus*, especies *rhamnosus*, *casei* y *plantarum*, principalmente y, en menor medida, a las especies *paracasei*, *acidophilus* y *delbrueckii*.
- Productos no lácteos a base de cereales: contienen, además de los probióticos, alto contenido de fibra, la cual tiene un efecto prebiótico en la salud humana. La mayoría de los productos a base de cereales se han elaborado a partir de fermentación láctica

de avena debido a su alto contenido proteico comparada con los demás cereales, sin embargo, también ha habido reportes de bebidas o budines a base de maíz o cebada malteada. Los microorganismos más utilizados en este tipo de productos incluyen a las bacterias *L. plantarum* y *reuteri*, y algunas levaduras como *Candida rugosa* o *lambica*, principalmente; así mismo, se ha reportado el uso de especies de *Bifidobacterium*.

- Productos no lácteos a base de cárnicos: este tipo de alimentos se encuentra altamente regulado y solamente incluye a los embutidos fermentados, como salchichas, salamis, salchichones o jamones. Los microorganismos más utilizados en este tipo de productos incluyen a especies del género *Lactobacillus*, como *casei*, *curvatus*, *pentosus*, *plantarum*, *sakei* y algunas especies de *Pediococcus*, como *acidilactii* y *pentosaceus*. También existen productos pesqueros comercializados con algunas especies de probióticos, como son el Ngari o el Tungap, los cuales suelen contener distintas especies de lactobacilos.

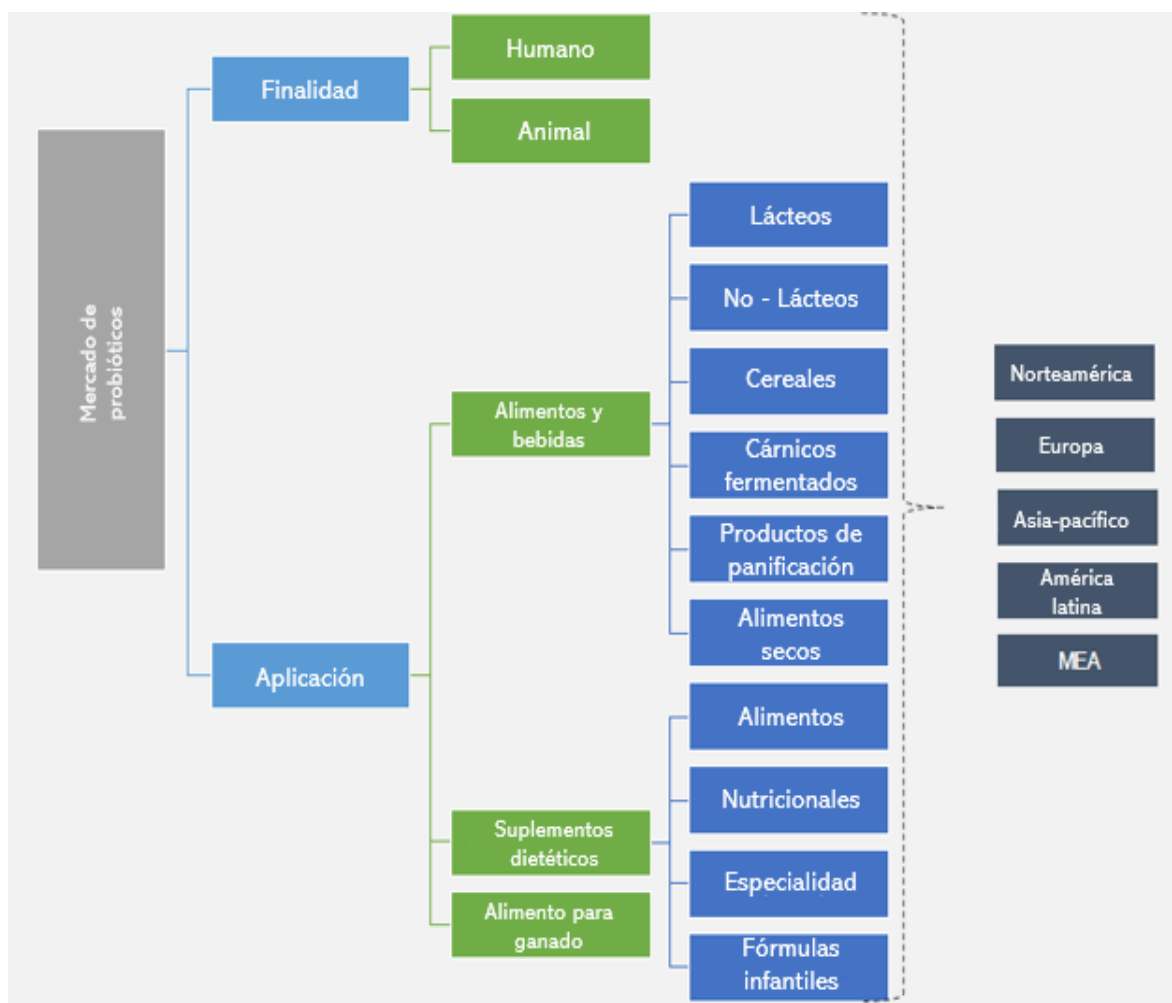


Figura 8: Segmentación de la industria global de probióticos (Global Markets Insights, 2017).

3. PREBIÓTICOS

3.1. Definición

En 1995, Glenn Gibson y Marcel Roberfroid introdujeron el concepto de “prebiótico” como un ingrediente alimenticio no digerible que afecta benéficamente al huésped al estimular selectivamente el crecimiento o la actividad de las bacterias del colon, y así mejorando la salud”. A partir de esta definición, y con el paso del tiempo, el término “prebiótico” le ha sido atribuido sólo a una gran variedad de carbohidratos, principalmente fructooligosacáridos y

galactooligosacáridos, que tienen efectos benéficos sobre la microbiota y que, al ser fermentados, generan ácidos grasos de cadena corta (Hutkins et al., 2016). Sin embargo, con los avances en las técnicas de biología molecular para la secuenciación de microorganismos del microbioma, se ha demostrado que existen una gran variedad de moléculas orgánicas (como ácidos grasos poliinsaturados, compuestos fenólicos y fitoquímicos) que tienen efectos benéficos sobre la salud (Gibson et al., 2017) pero, debido a la definición tradicional, no ha sido posible el poder denominar a estas sustancias “prebióticos”.

No fue sino hasta diciembre de 2016 cuando la Asociación Científica Internacional para Probióticos y Prebióticos (ISAPP por sus siglas en inglés) que se revisó la definición y se acuñó un nuevo término como “prebióticos” como “un sustrato que es utilizado selectivamente por los microorganismos huéspedes, el cual confiere un efecto positivo a la salud”; esta nueva definición no sólo considera a los derivados de carbohidratos, sino que ahora también toma en cuenta a otro tipo de sustancias orgánicas (lípidos y compuestos polifenólicos) mientras que no sea vean degradadas por acción enzimática del hospedero y, adicionalmente, no limita a su sitio de acción sólo al microbioma intestinal, sino que ahora también comprende otras regiones del cuerpo humano colonizadas por microorganismos (Gibson et al., 2017). Un ejemplo de qué tipo de sustratos se consideran prebióticos se muestra en la figura 9.

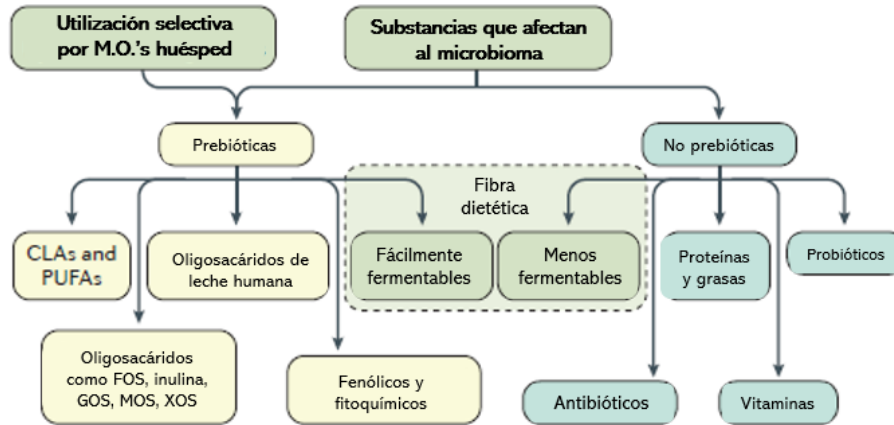


Figura 9: Diagrama para la clasificación e identificación de sustancias que se consideran prebióticas y no prebióticas (Modificado de Gibson et al., 2017).

CAPÍTULO III
MODELOS ESTADÍSTICOS RELACIONADOS CON SISTEMAS
BIOLÓGICOS

1. MODELOS ESTADÍSTICOS

1.1. Antecedentes

Con la escasez de recursos como uno de los principales retos para el siglo XXI, se ha impulsado cada vez más la necesidad de producir energías, materiales y sustancias sustentables y, gracias a los avances en microbiología industrial es que los productos elaborados a partir de fermentaciones microbianas hayan sido capaces de contribuir en gran medida a lograr este objetivo.

La industria fermentativa tradicional, desde sus orígenes, ha utilizado microorganismos provenientes de fuentes naturales para llevar a cabo una gran variedad de procesos, que contemplan desde la producción de cerveza hasta medicamentos. Tradicionalmente, el enfoque se ha encontrado en aislar a estos microorganismos innatos e inducirlos a que generen algún metabolito de interés en medios análogos a donde fueron aislados. Debido a la complejidad del metabolismo microbiano – por el gran número de reacciones y lo complejo de su regulación que varía de especie en especie – ha ido en aumento el uso de modelos matemáticos para la producción de metabolitos objetivos. Los modelos generados de esta manera – que no son otra cosa que funciones matemáticas – siguen un proceso cíclico de modelado, implementación y análisis (Tyo, Kocharin, & Nielsen, 2010). Tradicionalmente, la producción de un metabolito de interés inicia con el establecimiento de una estrategia de producción basada en el estudio de las rutas metabólicas de algún microorganismo, las cuales se modifican en alguna etapa – por aplicación de alguna enzima, desviaciones de rutas metabólicas alternas o modificaciones genéticas del microorganismo – seguida de la caracterización fisiológica de la fermentación, usualmente como rendimientos de producto. Es en este punto que el modelo se vuelve iterativo, donde el conocimiento generado del análisis previo sirve como bloque de construcción de modelos sucesivos y reiniciando el ciclo; este proceso, si bien sigue siendo utilizado en la actualidad, vuelve a estos modelos muy limitados pues

dependen de una gran variedad de factores como son la naturaleza del microorganismo, el medio en el que se desarrollaron, la regulación metabólica que rigió al proceso y la variabilidad genética a través de las generaciones de células, entre otros factores (Tyo, Kocharin, & Nielsen, 2010). Con el auge de las ciencias ómicas ha surgido un nuevo enfoque metodológico que se basa en utilizar pocos microorganismos y diseñar su metabolismo de tal manera que puedan producir de la manera más eficiente algún metabolito de interés, tal como se aprecia en la Figura 10; a este proceso se le conoce como ingeniería metabólica (Almquist, Cvijovic, Hatzimanikatis, Nielsen, & Jirstrand, 2014).

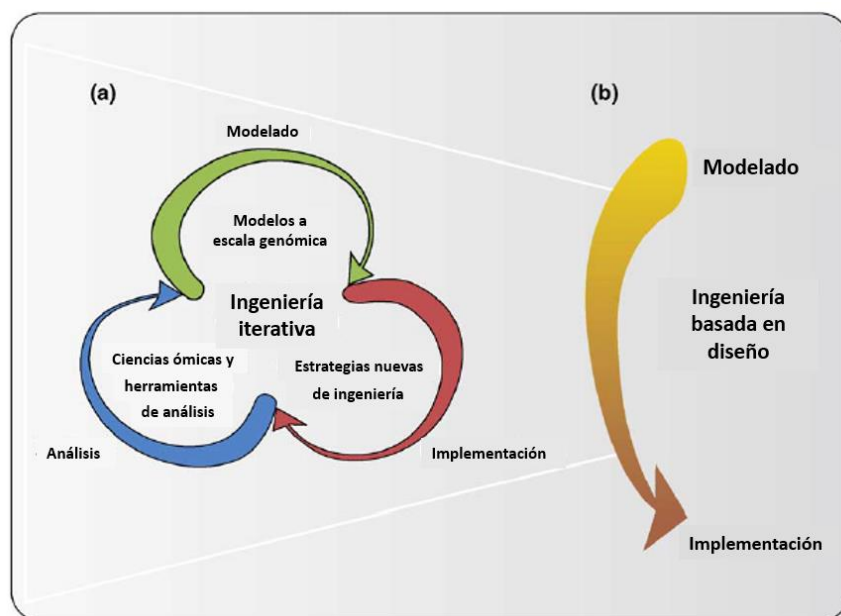


Figura 10: Transición desde la a) ingeniería iterativa hasta la b) ingeniería basada en el diseño, para microorganismos de interés industrial (modificado de Tyo, Kocharin, & Nielsen, 2010).

La microbiología industrial se ha beneficiado en gran medida por la introducción de estos tipos de modelos matemáticos, permitiendo la optimización de procesos como producción de ácido láctico, L-aminoácidos, hidrógeno, vainillina, terpenos, etanol, entre otros (Feist & Palsson, 2008). Dependiendo de su función, los modelos pueden ser de tipo mecanístico o empírico. Los primeros,

que suelen ser los preferidos para explicar el comportamiento de un proceso biotecnológico, se generan para representar los procesos bioquímicos relacionados con el crecimiento microbiano. Sin embargo, hay ocasiones cuando estos procesos no se conocen o sólo se conocen parcialmente. Cuando esto ocurre, los modelos generados deben ser evaluados por medio de su capacidad de ajustar los datos experimentales a una función definida; esto se lleva a cabo de manera estadística (McMeekin & Ross, 2002).

1.2. Bioestadística y modelado empírico

La estadística se puede definir como la ciencia de los datos, la cual conlleva la recolección, clasificación, compilación, organización, análisis e interpretación de éstos (Mendenhall & Sincich, 2012). Dentro de la estadística se cuenta con dos ramas: la estadística matemática, responsable de generar nuevos métodos de inferencia estadística, fuertemente sustentada en las matemáticas abstractas y la estadística aplicada, la cual implica la implementación de los métodos matemáticos, desarrollados por la primera rama, en áreas diversas del conocimiento como pueden ser economía, biología, medicina, psicología, etc. (Rosner, 2016). Como tal, la bioestadística es una derivación de la estadística aplicada la cual se basa en estudiar, desde la perspectiva matemática, problemas biológicos y médicos.

1.2.1. Cinética de crecimiento microbiano

En todos los procesos fermentativos las células microbianas se utilizan para la bioconversión de compuestos (substratos) a otros (productos) de mayor interés económico. En estos procesos, los microorganismos actúan como catalizadores biológicos altamente estereoespecíficos donde el gran número de células – también denominado biomasa – es responsable de la catálisis de reacción

(Stanbury, Whitaker, & Hall, 2003). Todos los procesos fermentativos, independientemente del tipo de reacción que desarrollen, se pueden descomponer en seis etapas:

- i. Formulación del medio de cultivo.
- ii. Esterilización del equipo y del medio fermentativo.
- iii. Producción de un cultivo axénico como pre-inóculo.
- iv. Crecimiento del microorganismo y producción fermentativa.
- v. Extracción y purificación de los productos.
- vi. Disposición de los efluentes del proceso.

Los procesos, además, pueden efectuarse en regímenes intermitentes (lotes), continuos o una combinación de ambos (lotes alimentados). El modo de operación depende, en gran medida, del tipo de metabolito que interesa producir. De todos éstos, los procesos por lote son los más sencillos de todos, pues consisten en sistemas cerrados donde las concentraciones iniciales de sustrato, biomasa y producto son conocidas (Stanbury, Whitaker, & Hall, 2003). Conforme se desarrolla la fermentación, una parte del sustrato que es consumido por los microorganismos es bioconvertido a producto, mientras que otra es destinada para llevar a cabo procesos de crecimiento y reproducción celular. Normalmente se suelen analizar los procesos fermentativos como cinéticas de crecimiento celular donde la tasa de crecimiento de los microorganismos a un tiempo determinado está en función de una serie de variables que dependen del medio en el que se encuentren. Existen una gran variedad de modelos empíricos que se han utilizado para representar el crecimiento microbiano, entre los que destacan modelos lineales multi-etapa, exponenciales, logísticos, sigmoidales, logarítmicos, entre otros (Mitchell, Von Meien, Krieger, & Dalsenter, 2004), tal como se aprecia en la figura 11. Estos modelos suelen considerar términos que permanecen prácticamente iguales independientemente del modelo cinético que se desarrolle; estas

“constantes cinéticas” se utilizan como parámetros para la caracterización de microorganismos en los distintos procesos fermentativos donde han sido probados, entre las que destacan la velocidad específica de crecimiento (μ) y las constantes de afinidad por el sustrato (q_s) o producto (q_p).

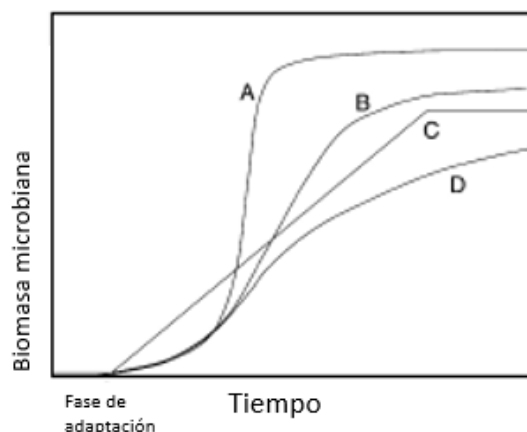


Figura 11: Perfiles cinéticos descritos en sistemas fermentativos por lote: (A) exponencial, (B) logístico, (C) lineal, (D) aceleración/desaceleración (modificado de Mitchell, von Meien, Krieger, & Dalsenter, 2004).

1.2.2. Modelos de regresión no lineales y su relación con los parámetros cinéticos de microorganismos

Usualmente, cuando se describe el crecimiento microbiano, los modelos logísticos o sigmoidales suelen ser los más adecuados para describir el comportamiento de todo el proceso, pues estos sí son capaces de considerar la etapa de adaptación de los microorganismos al medio, a diferencia de los demás modelos donde se deben analizar las etapas de crecimiento por partes. No existe realmente una ecuación empírica que describa el comportamiento del crecimiento microbiano que sea superior al resto, por lo que la evaluación de varios modelos para una misma serie de datos suele ser lo más habitual y su explicación se basa en la selección del modelo que ajuste, estadísticamente y de la mejor manera, la dispersión de datos (López, Prieto, Dijkstra, Dhanoa, & France, 2004). Este tipo de modelos son descritos, desde la perspectiva estadística, por medio de

análisis de regresión no-lineales. De acuerdo con Montgomery, Peck & Vining (2006), “hay muchos problemas en ingeniería y en ciencias donde la variable de respuesta y las variables predictoras se relacionan a través de una función no lineal conocida. Esto conduce a un modelo de regresión no lineal”. Existen una gran cantidad de modelos de regresión no lineales que han sido utilizados para la explicación del crecimiento microbiano como el modelo logarítmico, el modelo exponencial, el modelo logístico, la ecuación de Gompertz, la ecuación de Richards, entre otros (Dalgaard & Koutsoumanis, 2001). La versatilidad y la gran variedad de modelos de regresión no lineales permite estimar, en diferente medida y con distinto grado de exactitud, las constantes cinéticas relacionadas con el crecimiento microbiano y el proceso fermentativo donde cada modelo presenta ventajas y desventajas con respecto al resto, sin embargo, debido a la dificultad de aproximar estadísticamente cualquier modelo a los datos experimentales, estos ajustes suelen ser iterativos lo cual lleva a generar meramente un estimado cercano al valor real; para ello se suele utilizar software estadístico que permita llevar a cabo el análisis de regresión por medio de algoritmos iterativos como el método de Gauss-Newton, el método de máxima verosimilitud (MLE), el método Simplex o el algoritmo de Levenberg-Marquardt. La ventaja que presenta el análisis de regresión no lineal es que permite incluir modelos cuya respuesta exceda la uniformidad de los datos y que también puede ser parte de los parámetros de la regresión; por otro lado, presentan como desventaja que la estimación de los intervalos de confianza se vuelve muy complicado, particularmente si el modelo no lineal requiere de ponderación para mejorar el ajuste (Nyholm, Sörensen, & Kusk, 1992).

CAPÍTULO IV
METODOLOGÍAS *LEAN-SIX SIGMA*

1. METODOLOGÍAS DE CALIDAD PARA PROCESOS BIOLÓGICOS

1.1. Perspectivas

Tradicionalmente, los productos biofarmacéuticos implican procesos más tardados de manufactura con operaciones difíciles de controlar. Esta naturaleza del ramo biofarmacéutico resulta, con una frecuencia cada vez más regular, en falta de suministro por parte del productor (McGurk, 2009). Por otro lado, el descubrimiento y desarrollo de productos nuevos cada vez más se enfrenta a tasas de retorno inferiores, pues se enfrenta a una gran variedad de amenazas (Ullman & Boutellier, 2008), entre las que se pueden destacar:

- Regulaciones y requerimientos de los clientes para tratamientos de larga duración cada vez más estrictos.
- Complejidad en ciertas áreas terapéuticas.
- Complejidad de los compuestos terapéuticos desarrollados.
- Gran cantidad de farmacéuticas genéricas emergentes en Israel y países del sudeste asiático que lanzan productos aún cuando las patentes no hayan expirado.

Esta situación implica que las farmacéuticas busquen explorar nuevos paradigmas para satisfacer esta brecha de productividad, sin embargo, son pocas las empresas del ramo que hacen frente a estas situaciones con una estrategia claramente planteada ya que implica un acercamiento comprensivo tanto de la parte operacional como de la organizacional; como ejemplos de estrategias emergentes tenemos:

- QbD: desarrollos de calidad desde el diseño, el cual está basado en el diseño de experimentos, donde se lleva a cabo un acercamiento proactivo que requiere de identificar todos los atributos de los materiales y parámetros de proceso críticos, para determinar hasta qué punto pueden modificarse para mejorar la calidad de un proceso (DePalma, 2015). Este tipo de estrategias consta de cuatro etapas: definir la meta del producto diseñado, establecer el espacio de diseño del proceso, definir los parámetros de control del proceso y del producto y definir los límites operativos del espacio; así mismo es necesario tener en mente

los prerequisites del desarrollo, entre los que destacan tener el conocimiento adecuado del proceso, contar con el financiamiento económico para llevarlo a cabo, así como una administración de riesgos, administración del proyecto y administración regulatoria.

- Otra estrategia diferente se muestra en la figura 12, la cual consta de un enfoque integral y dinámico por medio de un acercamiento holístico a la situación de la empresa, donde es posible evaluar toda la cadena de suministro de la planta estableciendo claramente la capacidad de producción, rendimientos, confiabilidad, flujo de documentación, tiempos de ciclo y otros elementos claves de desempeño (KPI) y generar cambios rápidos (con objetivos alcanzables en 12 meses o menos) y permitiendo así cumplir con las expectativas de un mercado cada vez más acelerado (McGurk, 2009).

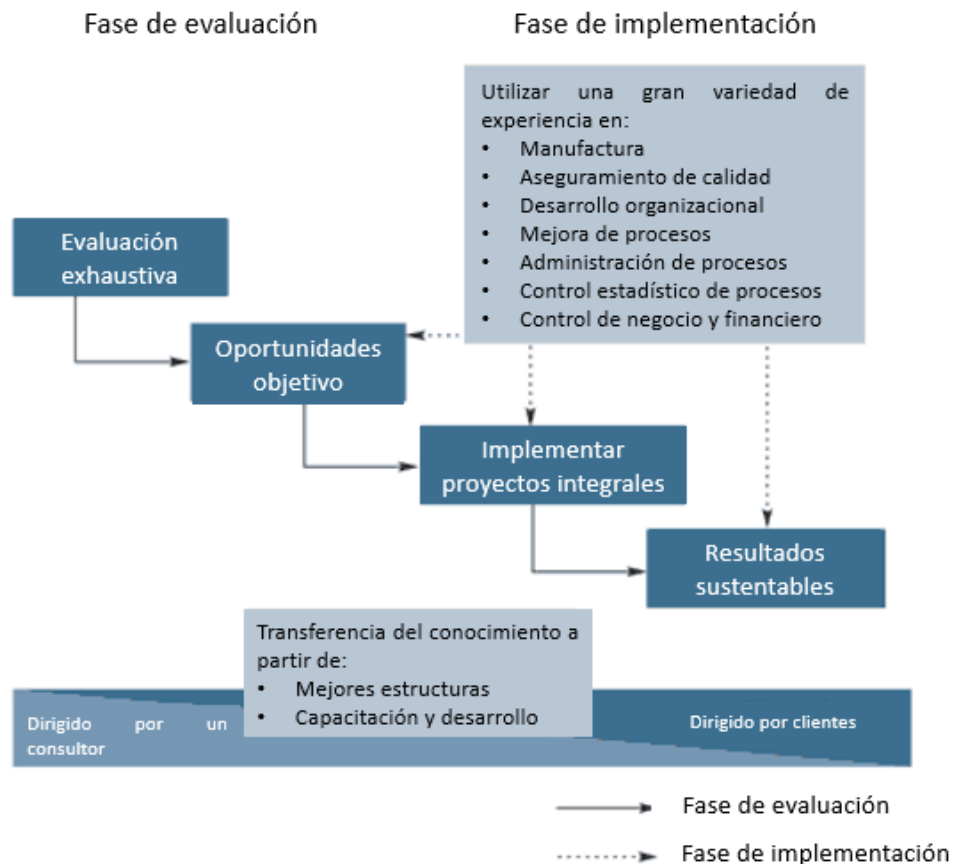


Figura 12: Acercamiento rápido para mejoras operacionales y de cumplimiento (modificado de McGurk, 2004).

Este ejemplo está basado en la implementación de una de las nuevas estrategias que existen en otros ramos de la industria para abordar este tipo de retos, que es la implementación de *Lean Manufacturing* – para reducción de tiempos de ciclo, mejora de inventarios y minimización de costos de manufcatura, en conjunto con un programa *Six Sigma* – para mejorar el control del proceso y aumentar el rendimiento de producción (Snee, Digging the Holistic Approach: Rethinking Business Improvement to Improve the Bottom Line, 2009).

1.2.Implementación de *Lean – Six Sigma*

Lean Manufacturing tiene sus orígenes en el sistema de prodycción desarrollado por Toyota el cual tiene como propósito la eliminación de desperdicios a través de actividades de mejora continua (Villaseñor-Contreras & Galindo-Cota, 2009). Para implementar Lean en un área de producción se tienen una serie de pasos establecidos, basados en 14 principios dentro de 4 categorías: filosofía a largo plazo, proceso con la finalidad de producir resultados correctos, agregar valor a la organización y resolver problemas de raíz. Para lograr esto, se suelen implementar una serie de herramientas y técnicas dentro de tres niveles que se deben alcanzar durante la aplicación de la metodología *Lean* (Villaseñor-Contreras & Galindo-Cota, 2009):

- Definición de la demanda del cliente: Permite entender las necesidades del cliente teniendo en cuenta las características de calidad, tiempos de entrega y precio. Implica la implementación de herramientas como el mapeo de cadena de valor, cálculo del *Takt-time* o *Pitch-time*, generación de sistemas *Andon*, entre otros.
- Flujo continuo: Es implementar un flujo continuo de recursos e información a lo largo de toda la compañía para que los clientes internos y externos reciban los productos indicados en el tiempo que necesitan y en cantidades correctas. Las herramientas desarrolladas en esta etapa son las 5 S's, balanceo de líneas de trabajo, trabajo estandarizado, *jidoka*, eventos *kaizen*, entre otros.
- Nivelación: Se utiliza para distribuir uniformemente el trabajo, por volumen y variedad, para reducir inventarios en proceso y final, permitiendo al cliente pedir órdenes en pequeñas

cantidades. Para esta etapa, las herramientas más usuales son *Heijunka*, retiros constantes y sistemas *pull*.

Por otro lado, desde su desarrollo en Motorola en los 80's, ha habido muchos avances y mejoras en las estrategias de mejora de *Six Sigma*. Esta metodología es un sistema riguroso, enfocado y altamente eficiente e implementación de calidad que se enfoca en tener desempeños libres de errores, es decir, reduciendo al mínimo la variabilidad de un proceso (Pyzdek & Keller, 2010); un programa *Six Sigma* se basa en la aplicación de un modelo conocido como DMAIC, donde cada letra representa una etapa del desarrollo de la metodología:

- D: Definición de las metas de las actividades de mejora.
- M: Medición del sistema actual.
- A: Análisis del sistema para identificar maneras de eliminar brechas entre el sistema actual y la meta.
- I: Mejora (*improvement* en inglés) del sistema al estado ideal.
- C: Control del nuevo sistema.

Para las organizaciones que buscan implementar este tipo de metodologías en sus procesos, concretamente, la metodología *Lean – Six Sigma* (LSS) es una estrategia de negocio que permite mejorar el desempeño con enfoque en la satisfacción del cliente y, cuyo resultado de fondo, es el aumento de utilidades (Snee, 2012). La manera en que se mide la mejora de desempeño es con base en la calidad, costo, suministro y satisfacción del cliente, permitiendo que la organización tenga un flujo de efectivo positivo al tiempo que integra el factor humano con los procesos productivos. Si bien cada metodología por separado presenta fortalezas, la fusión de ambas permite un acercamiento holístico – único – que no se podría lograr de manera aislada. La manera en que se suele implementar LSS se muestra en la figura 13 (Snee, 2012). Se aprecia que, al tener un enfoque integrador aplicando las dos metodologías de manera simultánea, un proyecto LSS permitirá tomar las metas del negocio para la generación de proyectos de mejora o atacar las brechas operativas de la organización, por medio de una estrategia robusta de selección de proyectos, basada en los siguientes tres principios:

- Lograr una relación de valor máxima en función de las metas del negocio.
- Mejorar el desempeño del proceso que se desea abordar o que fue detectado como un problema de la empresa.
- Mejorar el flujo de materiales y de información al mismo tiempo que se reducen los desperdicios y los tiempos de ciclo.

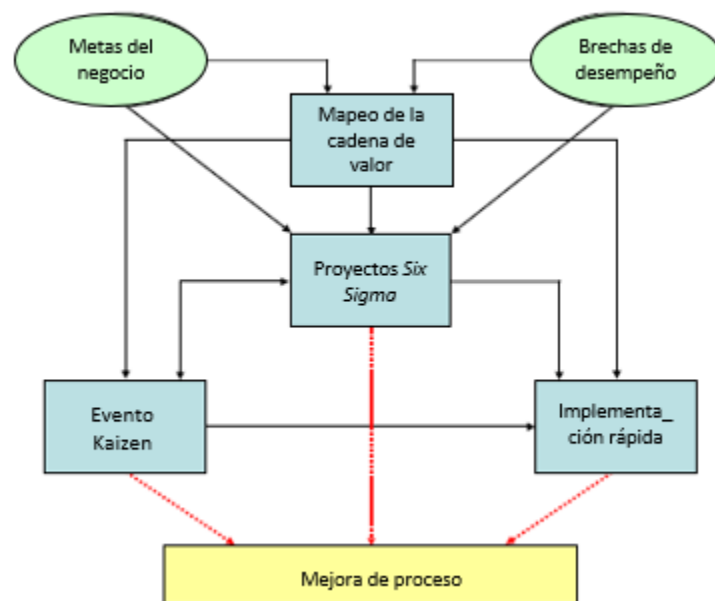


Figura 13: Selección de proyectos de mejora para la implementación de LSS (modificado de Snee, 2012).

CAPÍTULO V
ESTRATEGIA DE IMPLEMENTACIÓN

1. IMPLEMENTACIÓN DE LA METODOLOGÍA LEAN

1.1. DESCRIPCIÓN DEL PROCESO DE PRODUCCIÓN

El proceso que se describe a continuación fue una propuesta de producción de microorganismos probióticos por un sistema híbrido continuo – mantenimiento por lote alimentado (CCLA). En este proceso se buscó maximizar el crecimiento de biomasa de un cultivo mixto compuesto por LR, LP y SB. Para ello, como se aprecia en la figura 14, tres cultivos continuos, uno para cada lactobacilo y otro para la levadura, se deben llevar a cabo hasta lograr la etapa de crecimiento estacionaria de cada uno de ellos con concentraciones celulares no menores a 10^9 UFC mL⁻¹; una vez logrado el crecimiento deseado de los microorganismos, estos son alimentados a un reactor de mantenimiento operado en cultivo por lote alimentado con flujo constante, de acuerdo con trayectorias de alimentación con las cuales se desarrollará de la manera más eficiente posible cometabolismo entre los distintos microorganismos, concluyendo con su cosecha en etapas posteriores del proceso. A la fecha, no se ha encontrado ninguna referencia publicada que utilice un proceso similar para la producción de probióticos.

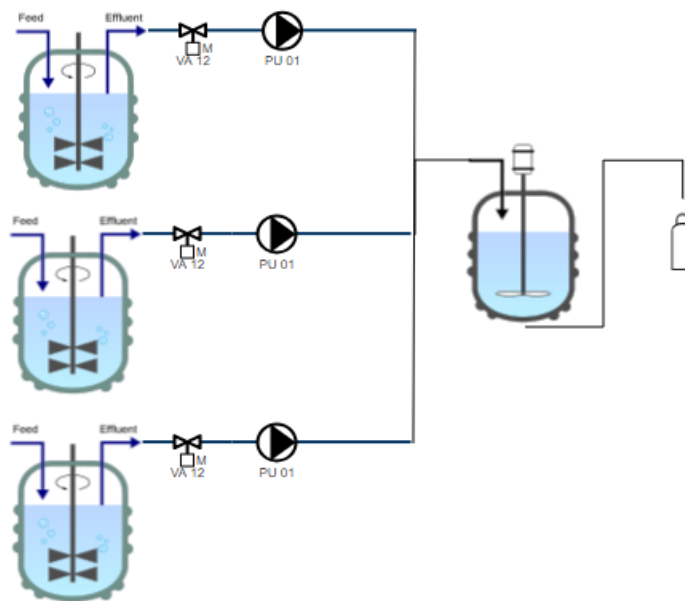


Figura 14: Diagrama ISO del sistema híbrido en cultivos continuos – lote alimentado (CCLA) para la producción de un cultivo mixto probiótico.

1.1.1. DISEÑO DEL DIAGRAMA DE FLUJO DEL PROCESO

Para el desarrollo del diagrama de flujo del proceso, se planeó en dos etapas sucesivas: inicialmente una desarrollada a nivel laboratorio, en biorreactores de 0.25 L, para un escalamiento en una segunda etapa a nivel piloto para volúmenes de producción de 7 L en el biorreactor de mantenimiento. En la figura 15 se muestran un diagrama de estado inicial de las etapas requeridas por el proceso a nivel laboratorio. Se muestra la frecuencia de operación de cada etapa con sus totales por proceso, con tiempos estimados de operación (y total) basados en procesos similares desarrollados en otros proyectos (Gutiérrez-García, 2015) y por medio de pruebas preliminares desarrolladas a nivel laboratorio, las cuales se describen en los apartados subsiguientes de este documento. Se indicó un costo unitario por lote hasta la validación del proceso en el escalamiento al biorreactor de 7 L.






Proceso observado:		Producción de probióticos por CCLA a escala laboratorio (0.25 L)										
ACTIVIDADES		PROCESO					CARACTERÍSTICAS DE LA ACTIVIDAD					
Paso	Actividades						V.A.	P.C.	Otros	Frecuencia	Tiempo [h]	Costo [MXN]
1	Recepción de materias primas			●					x	1	0.17	1
1	Inspección de materias primas		●					x		1	0.17	1
2	Acondicionamiento de materias primas	●					x			1	1.00	1
3	Elaboración de melazas de betabel	●					x			1	3.00	1
4	Caracterización de melazas de betabel		●					x		1	1.00	1
5	Elaboración de extracto de té verde	●					x			1	0.33	1
6	Caracterización del extracto de té verde		●					x		1	1.00	1
7	Mezclado del medio de cultivo	●					x			1	0.17	1
8	Acondicionamiento de reactores	●					x			1	1.00	1
9	Esterilización de reactores con medio	●					x			1	2.00	1
10	Precultivos y acondicionamiento de MO's	●					x			1	72.00	1
11	Inoculación de reactores	●					x			1	0.33	1
12	Caracterización de medios de fermentación		●					x		1	1.00	1
13	Fermentación	●					x			1	24.00	1
14	Cosecha de biomasa	●					x			1	0.33	1
15	Caracterización de productos de fermentación		●					x		1	1.50	1
TOTALES		10	5	2	0	0	10	5	1	16	109.00	16

Figura 15: Diagrama de estado inicial de flujo del proceso de producción de probióticos por CCLA a escala laboratorio (0.25 L). (●) proceso de valor agregado, (■) proceso de inspección, (➡) proceso de transporte, (⬢) proceso de demora, (◇) proceso de decisión; V.A. valor agregado; P.C. proceso de control.

1.2.DEFINICIÓN DE LA DEMANDA Y NECESIDADES DEL CLIENTE

Debido a que no se cuenta con una cartera de clientes ya que se trató de un proyecto de diseño, para la estimación de la demanda se tomaron datos similares a los reportados por otros productores (Global Market Insights, 2017), (Cantera, 2016); en el sector de suplementos, fue posible reconocer que en México se comercializan no más de 10 productos similares, entre los que destacan las marcas locales Vivera®, producido por Laboratorios Merck, Ventro®, producido por Kurago Biotek, Probióticos Lactobacillos, producidos por Nutrix, Probvioptal®, producido por Laboratorios Bomuca, así como una variedad de marcas importadas como Probiotix®, ProBioGen®, Probiotics Vega®, entre otros; fue con base en esta información que se desarrollaron las siguientes herramientas para definir una demanda y necesidad de clientes potenciales:

1.2.1. DESPLIEGUE DE LA FUNCIÓN DE CALIDAD

Se aplicó una encuesta a 77 consumidores mexicanos, al azar, de edades entre 20 y 60 años. A partir de los datos obtenidos, fue posible definir unas de las necesidades de los consumidores potenciales de probióticos, así como sus ponderaciones. El tamaño de muestra se calculó por medio de Minitab® 18, con base en un modelo binomial con 5 % de significancia. Para ello, se definió una proporción de consumidores de probióticos de 85 % del total de encuestados con 10 % de margen de error para los intervalos de predicción. A partir de la información obtenida de la encuesta, se desarrolló un despliegue de la función de calidad (QFD) por medio de una matriz de casa de calidad (HOQ); los apartados del HOQ se completaron de acuerdo con los siguientes criterios:

- Los requerimientos del cliente se definieron con base en las categorías generales expresadas por los consumidores en la encuesta. Para calcular la ponderación de los requerimientos del cliente, de cada uno de ellos, se promedió la importancia (expresada con números enteros entre 0 y 10) que le asignaron los encuestados para obtener la importancia promedio del requerimiento. Posteriormente, de acuerdo con la ecuación 1 se calculó la ponderación del requerimiento.

$$Ponderación = 100 \left(\frac{\text{Importancia promedio del requerimiento del cliente}}{\sum \text{Importancias promedio de los requerimientos}} \right) \quad \text{Ecuación 1}$$

- Como no se cuenta actualmente con un producto, las ponderaciones se hicieron con base en los productos probióticos de venta actual en el mercado que los consumidores identificaron, en una escala de 0 a 5, siendo cero la menor ponderación de cada criterio y cinco, la mayor ponderación posible. Debido a la gran variedad de respuestas, se hicieron agrupaciones de competidores de acuerdo con la naturaleza de los productos probióticos.
- Los requerimientos técnicos y la dirección de mejora se definieron con base en las capacidades del proceso de producción en lote alimentado en biorreactor a escala de 7 L; dirección de mejora positiva (▲), dirección de mejora negativa (▼) y parámetro en objetivo (x).
- La matriz de relaciones se definió con base en las combinaciones de los requerimientos del cliente y los requerimientos técnicos, por medio de una escala de cuatro puntos: relación alta (⊖ 9 puntos), relación media (○ 3 puntos), relación baja (▲ 1 punto), relación nula (0 puntos).
- Las relaciones entre requerimientos técnicos se definieron como altamente positivas (++) y positivas (+) cuando el efecto de mejora del primero de ellos resulta en la mejora el de segundo, negativas (−) y altamente negativas (▼) cuando el efecto de mejora del primero de ellos perjudica al segundo o nulas () cuando los efectos son independientes.
- Finalmente, se definieron los valores objetivo o límite para cada uno de los requerimientos técnicos, así como la dificultad (en una escala de 0 a 10, de manera ascendente) para lograrlos. Para calcular la ponderación de los requerimientos técnicos, primero se calculó la importancia del requerimiento, de acuerdo con la ecuación 2:

$$Importancia = \sum_{i=1}^n (RC * PRC) \quad \text{Ecuación 2}$$

Donde RC es la relación de las “i” combinaciones {0, 1, 3, 9} y PRC es la ponderación de los requerimientos del cliente, calculada con la ecuación 3. Una vez calculada la importancia del requerimiento, la ponderación se calculó de acuerdo con la ecuación 3:

$$Ponderación = 100 \left(\frac{Importancia \text{ promedio del requerimiento técnico}}{\sum Importancias \text{ promedio de los requerimientos}} \right) \quad \text{Ecuación 4}$$

1.2.2. MAPEO DE LA CADENA DE VALOR (VSM)

A partir de la información recabada durante el escalamiento a nivel piloto fue posible desarrollar un mapeo de cadena de valor (VSM) de estado ideal donde se describió el flujo de actividades primarias (incluyendo las tres etapas del proceso de producción de microorganismos probióticos en CCLA) y secundarias (con base en la logística de suministro y compra de los departamentos DPTI y Compras de ITESO). Para el cálculo de los indicadores del VSM de estado ideal, se utilizaron las ecuaciones 5 – 7.

$$PLT = \sum_{i=1}^n LTP_i \quad \dots \text{Ecuación 5}$$

$$PPT = \sum_{i=1}^n PTP_i \quad \dots \text{Ecuación 6}$$

$$FPY = \prod_{i=1}^n Yield_i \quad \dots \text{Ecuación 7}$$

Donde PLT es el *Production Lead Time* (en horas) y LTP, el *Lead Time* de cada proceso (en horas), PPT es el *Production Process Time* (en horas), PTP, el *Process Time* de cada proceso (en horas), FPY es el *First Pass Yield* (en % p/v).

1.2.3. CÁLCULO DEL TAKT-TIME Y DEL PITCH

El cálculo del *Takt-time* del proceso se definió para calda CCLA en biorreactor de 7 L, tomando en cuenta las siguientes consideraciones:

- El análisis se realiza por lote ya que el paso limitante es el lote alimentado en el biorreactor de mantenimiento, al final del proceso.
- La producción del medio MBT se realizó en un proceso en línea a nivel piloto, donde la extracción del jugo de betabel se lleva a cabo en un despulpador, seguido de un prensado por filtro-prensa y, finalmente, evaporación atmosférica, mientras que la extracción de té verde, en marmita.

- La activación del inóculo (pre-cultivo) se realiza a nivel laboratorio; esto incluye los procesos de preparación y esterilización de los medios de cultivo comerciales para hacer los pases sucesivos de las cepas durante 48 h.
- La línea de fermentación se lleva a cabo de 2 a 3 biorreactores semilla que alimentan a un solo reactor de mantenimiento, a nivel piloto.
- La cosecha de células se lleva a cabo a nivel piloto por centrifugación.
- Se consideró que cada lote de producción para los 7 L de probióticos tiene una duración de 2 días, en promedio (de acuerdo con los formatos de observaciones de tiempos) y el proceso se opera 6 días a la semana, con 4 operadores en turnos de 8 horas con descansos intermitentes.
- Debido a naturaleza del proceso donde, se optimizaron los tiempos de los pases sucesivos para los preinóculos, así como los tiempos de fermentación, como procesos paralelos que no requieren de la presencia absoluta de los operadores durante su ejecución, reduciendo así el tiempo del proceso y considerando los tiempos de descanso y comida de los operadores dentro de estas actividades paralelas.

Con base en estas consideraciones, la secuencia de cálculo para el *Takt-time* (en h) se muestra en la ecuación 8:

$$Takt - time = \frac{\text{Tiempo total disponible por turno}}{\text{Demanda promedio}} \quad \dots \text{Ecuación 8}$$

Donde el tiempo total disponible por turno (TTDT en h) se calcula con la ecuación 9:

$$TTDT = \frac{\text{Horas de trabajo por turno} - \text{horas de descanso y comida por turno}}{\text{Turnos por día}} \quad \dots \text{Ecuación 9}$$

Finalmente, como se trata de un proceso donde la última etapa (el cultivo en lote alimentado) representa un cuello de botella al tratarse de un proceso por lote, se optó por analizar el sistema por medio del cálculo del *pitch* o lotes controlados (en h L⁻¹), para lo cual se tomó en cuenta el volumen de producción del biorreactor operado en lote alimentado para poder definir a cada una de las unidades de producción como 1 L. El *pitch* del proceso se calcula de acuerdo con la ecuación #10:

$$Pitch = Takt - time * unidades\ de\ producción \quad \dots Ecuación\ 10$$

1.3.FLUJO CONTINUO DEL PROCESO

1.3.1. DIAGNÓSTICO DEL PROCESO PARA IMPLEMENTACIÓN DE LAS 5'S Y SU ESTANDARIZACIÓN

El proceso de producción de probióticos en CCLA se planeó en tres etapas operativas:

- Elaboración y acondicionamiento de los materiales (medios de cultivo/preinóculos).
- Proceso fermentativo (incluye acondicionamiento, esterilización e inoculación).
- Cosecha de células (incluye análisis del producto terminado).

Por medio de pruebas preliminares a nivel laboratorio se generó un diagnóstico de cada una de las actividades de cada etapa con el fin de evaluar los requerimientos (materiales, personal y tiempos) para cada una de ellas y poder desarrollar la estandarización de la operación. El diagnóstico se llevó a cabo por medio de un cuestionario de auditoría 5's obteniendo un puntaje de 7 de 25, es decir, 28 % de cumplimiento con la política de calidad. Una vez identificadas las áreas de mejora del proceso, durante el escalamiento del cultivo por lote alimentado a 7 L se registraron las evidencias de mejora de la auditoría en un formato de implementación de 5's; así mismo se procedió a tomar registro de los tiempos de cada actividad de los distintos procesos, registradas en un formato de observaciones de tiempo donde, para cada actividad, se registró el mejor tiempo repetible de cinco observaciones llevadas a cabo (en horas), sin embargo, para aquellas que no presentaron repeticiones de tiempo, se promediaron aquellas observaciones que resultaran lo más cercanas entre sí. Cada una de estas mediciones se llevaron a cabo utilizando cronómetros digitales Traceable® de Control Company al momento de ser efectuadas por alguno de los seis operadores. A partir de

esta información se generó una hoja de trabajo estandarizado, donde se representó, de manera gráfica, las actividades de operación y contrastadas contra el *Takt-Time* del proceso, para generar un análisis de brechas. Las brechas (GAP), fueron calculadas de acuerdo con la ecuación 11:

$$GAP = TP - TT \quad \dots \text{Ecuación 11}$$

Donde TP es el tiempo total del proceso (en horas) y TT el *Takt-Time* (en horas).

1.4. BALANCE DEL PROCESO

1.4.1. BALANCE DE CARGA DE TRABAJO

A partir del análisis de brechas generado en la sección anterior se realizó un balance de carga de trabajo por *pitch*, el cual se calcula de acuerdo con la ecuación 12:

$$BCT = \frac{\sum_{i=1}^n MTR_i}{Pitch} \quad \dots \text{Ecuación 12}$$

Donde BCT es el número de operadores resultantes del balanceo de carga de trabajo, redondeado hacia la unidad superior y MTR es el mejor tiempo repetible (en horas) por actividad.

2. IMPLEMENTACIÓN DE LA METODOLOGÍA SIX-SIGMA: DMAIC

Se desarrolló la metodología DMAIC desde la definición del problema (D) de producción de probióticos a partir del medio MBT, la estandarización de medición (M), el análisis (A) y hasta las acciones de mejora (I). Cada uno de los apartados desarrollados se muestran a continuación:

2.1. DEFINICIÓN DEL PROBLEMA

2.1.1. Project Charter

Con base en los objetivos planteados al inicio de este documento, se desarrolló un programa de definición de las necesidades del proyecto. Este programa fue representado en dos documentos que se pueden consultar en el anexo de este documento. En el primero de ellos, el *Project Charter*, se definieron los alcances del proyecto, el reto del proyecto proyectado como oportunidad de negocio, así como las metas a lograr con base en los objetivos del proyecto global, incluyendo los objetivos

financieros de éste los cuales se establecieron calculando la reducción de costos por el uso del medio de cultivo optimizado (MBT) y calculando la reducción de costos de operación por el sistema híbrido CCLA, una vez escalado el proceso a 7 L; de igual manera, se definieron los entregables del proyecto cuyos tiempos se definieron a partir de un diagrama de Gantt del proceso desarrollado durante los periodos de IDI 3 y 4.

2.1.2. Formato A3

Adicional al *Project Charter*, se generó un formato A3 el cual permite evaluar, etapa por etapa, la definición del problema. Inicialmente, por medio de una tormenta de ideas se generó un análisis FODA del proyecto, permitiendo la declaración del problema con base en los costos y rendimientos del proceso de producción de probióticos por CCLA a escala piloto de 7 L. Posteriormente, se generó un diagrama de Pareto identificando los principales contribuyentes como impacto económico y de productividad del proceso. Las ponderaciones se calcularon de acuerdo con la ecuación 13:

$$Ponderación = 100 * \left(\frac{Costo\ del\ proceso}{\sum_{i=1}^n Costo\ del\ proceso_i} \right) \quad \dots Ecuación\ 13$$

Una vez establecidos los principales contribuyentes al problema, se generó un diagrama de causa-raíz en el cual se definieron los factores para siete categorías que impactaron sobre el efecto de costos y productividad del proceso. Para complementar la estrategia de solución, se desarrolló un SIPOC del proceso, con base en el diagrama de flujo optimizado una vez escalado el proceso a biorreactor de 7 L en CCLA; en el SIPOC se declaran todos los proveedores (S) tanto de servicios como materiales del proceso, las entradas al proceso optimizado (I), las etapas del proceso optimizado (P), las salidas del proceso optimizado, tanto producto terminado como información y análisis (O) y, finalmente, clientes internos y externos al proceso (C). Finalmente, se definieron las herramientas y estrategias para llevar a cabo las etapas subsiguientes de Medición y Análisis del proyecto.

2.2.MEDICIÓN

2.2.1. PLAN DE COLECCIÓN DE DATOS X|Y

Para definir las variables críticas del proceso se generó un plan de colección de datos en el cual se establecieron las relaciones entre las posibles variables independientes (pH, temperatura, oxígeno disuelto, agitación, inóculo inicial, régimen de operación y medio de cultivo) con la variable dependiente de interés (crecimiento celular). Así mismo, se caracterizaron y estandarizaron las herramientas de medición, así como las técnicas analíticas para la cuantificación de cada una de las variables. Los procedimientos de estandarización se muestran a continuación:

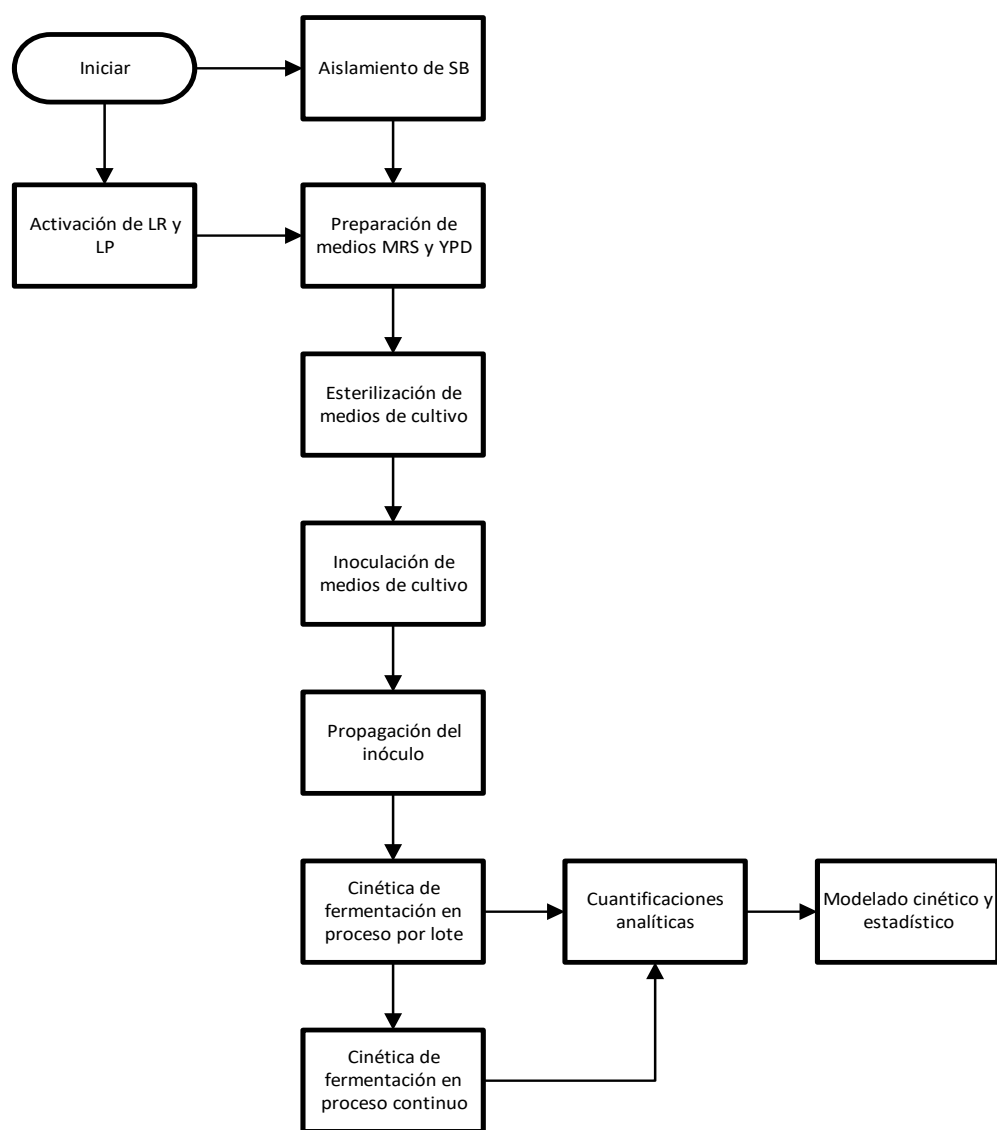
2.2.2. CARACTERIZACIÓN DE LOS PARÁMETROS CINÉTICOS DE CRECIMIENTO DE LOS TRES MICROORGANISMOS EN MEDIOS COMERCIALES

2.2.2.1. DESCRIPCIÓN DEL PROCEDIMIENTO

Cepas de *LR* y *LP* se obtuvieron de Raff Lactointredientes S.A. de C.V., México, *SB* fue aislado del medicamento Floratil® (200 mg – Merck™). El aislamiento se realizó colocando una cápsula entera en medio líquido de crecimiento YPD (SIGMA™ Y1375) a 32 °C, 150 rpm por 72 h. Una vez crecido el cultivo, se verificó la morfología colonial (macro y microscópica) por medio de siembras en caja Petri utilizando la técnica de estriado cruzado hasta garantizar un cultivo axénico. Los cultivos se conservaron liofilizados en congelación a -5 °C. La reactivación y propagación de *LR* y *LP* se realizó en MRS (Difco™ 288130) y de *SB* en medio YPD. Los medios se inocularon con 5 % (p/v) de células liofilizadas y se incubaron mediante pases sucesivos (48 h – 24 h – 12 h) a 37 °C en agitación orbital (150 rpm) hasta lograr una concentración celular de 10^7 UFC mL⁻¹. Posteriormente se llevaron a cabo los cultivos por lote, los cuales se realizaron por triplicado utilizando biorreactores Applikon My-Control® (en medio MRS para *LP* y *LR*, y en medio YPD para *SB*) en condiciones de operación para *LP* y *LR*: $V_{OP} = 200$ mL, $pHi = 6.5 \pm 0.2$, 150 rpm, 37 ± 0.5 °C, $O_2 > 5$ %, $x_0 = 5\%$ v/v y en condiciones de operación para *SB*: $V_{OP} = 200$ mL, $pHi = 6.5 \pm 0.2$, 150 rpm, 30 ± 0.5 °C, $O_2 > 20$ %, $x_0 = 5\%$ v/v. La duración de los cultivos fue de 24 h con una frecuencia de muestreo de 2 h, las cuales fueron extraídas en condiciones de esterilidad, centrifugadas a 10,000 rpm, 5 min, para separar el paquete celular y, posteriormente, mantenidas

en refrigeración hasta su análisis fisicoquímico y microbiológico. A las muestras acondicionadas se les analizaron biomasa por densidad óptica (a 660nm) correlacionada con peso seco, crecimiento y conteo en placa, carbohidratos totales por el método de la antrona, carbohidratos reductores por el método de Miller y ácido láctico por el método modificado de Borshchevskaya y colaboradores. Los resultados experimentales y las curvas de calibración se analizaron utilizando el software Minitab® 18.

2.2.2.2. DIAGRAMA DEL PROCESO



2.2.3. FUNDAMENTO DE LAS TÉCNICAS ANALÍTICAS

2.2.3.1. Crecimiento por peso seco

- Basado en el Método Estándar para la determinación de Sólidos Totales en Biomasa (American Society for Testing and Materials [ASTM], 1996).

Esta técnica se basa en la pérdida de humedad por calentamiento indirecto (convección) y la cuantificación gravimétrica de los sólidos solubles y sólidos totales restantes en la muestra después del secado.

Para la cuantificación de la muestra, se pesaron entre 0.5 y 2.0 g de muestra homogénea la cual se colocó en charolas de aluminio previamente llevadas a peso constante en estufa de desecación (ShellLab CE5F-ZZMFG operada a 105 ± 3 °C) y reposadas en desecador de CaCl_2 . Una vez colocada la muestra y registrado su peso inicial, se colocó la charola de aluminio conteniendo la muestra en estufa de desecación (105 ± 3 °C) durante, al menos, 4 h y hasta lograr peso constante. Transcurrido el tiempo, se colocó la charola con la muestra seca en un desecador hasta alcanzar temperatura ambiente. Posteriormente, se pesó la charola de aluminio conteniendo la muestra y se registró el valor. El cálculo de sólidos totales se calculó de acuerdo con la ecuación 14. Todas las determinaciones se efectuaron por duplicado.

$$\% \text{Sólidos totales} = 100 \left(\frac{\text{Peso}_{\text{charola con muestra seca}} - \text{Peso}_{\text{charola}}}{\text{Peso}_{\text{muestra}}} \right) \quad \dots \text{Ecuación 14}$$

Así mismo, se elaboró una curva de calibración que correlacionara el peso seco de biomasa con la densidad óptica del cultivo y con el crecimiento en placa (ver Anexo I), utilizando un cultivo axénico de LP crecido durante 48 h en medio MRS como estándar desde 0 hasta 7 g L^{-1} de biomasa. Todas las determinaciones se efectuaron por triplicado.

2.2.3.2. Crecimiento por densidad óptica

- Basado en el Método de Myers, Curtis & Curtis, 2013, para la determinación de Biomasa por Densidad Óptica.

Esta técnica se basa en la medición de la intensidad de luz transmitida por un espectrofotómetro que no es absorbida por una suspensión celular al recorrer una distancia fija; se basa en la ley de

Lambert y Beer (ecuación 15), la cual permite correlacionar linealmente la concentración de una muestra con la atenuación de luz que pasa a través de ella.

$$D.O. = -\log\left(\frac{I}{I_0}\right) = \varepsilon * c * l \quad \dots \text{Ecuación 15}$$

Donde D.O. es la concentración celular, I_0 es la intensidad de luz incidente, I es la intensidad de luz transmitida que ha pasado a través de la muestra y detectada por el instrumento, ε es el coeficiente de atenuación, c la concentración de la muestra y l la distancia recorrida por el haz de luz.

Para la cuantificación de la muestra, a la suspensión bacteriana se le efectuó dos procesos de lavado con solución salina estéril y diluida (NaCl 0.8% p/v) con ciclos de centrifugación (10,000 rpm 5 min) desechando el líquido sobrenadante y resuspendiendo las células por agitación con vórtex. Posteriormente, se efectuaron lecturas de absorbancia en un espectrofotómetro (Thermo-Scientific Genesys 10S) a una longitud de onda de 660 nm (Myers, Curtis, & Curtis, 2013) ajustando a 0 de absorbancia con una solución salina libre de células. Todas las determinaciones se efectuaron por duplicado.

Así mismo, se elaboró una curva de calibración que correlacionara el peso seco de biomasa con la densidad óptica del cultivo (ver Anexo I), utilizando un cultivo axénico de LP crecido durante 48 h en medio MRS como estándar desde 0 hasta 7 g L⁻¹ de biomasa. Todas las determinaciones se efectuaron por triplicado.

2.2.3.3. Conteo en placa

- Basado en la Norma Oficial Mexicana NOM-092-SSA1-1994 (Bienes y Servicios. Método para la cuenta de bacterias aerobias en placa).

Esta técnica se basa en el conteo de las colonias bacterianas (UFC), que se desarrollan en el medio de elección después de un cierto tiempo y temperatura de incubación; permite, además, la descripción morfológica macroscópica de las colonias y la validación visual de la pureza de un cultivo axénico.

Para la cuantificación de la muestra, en condiciones de esterilidad, se hicieron diluciones decimales en caldo peptonado (1 g L⁻¹ peptona de caseína) desde 0 hasta 1:10,000, sembrando 1

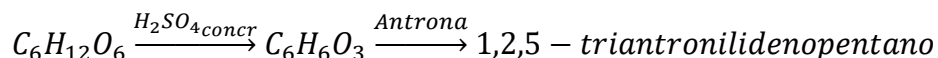
mL de las diluciones bacterianas en cajas de Petri conteniendo medios comerciales MRS (LP, LR) o YPD (SB) por medio de la técnica de estriado masivo. Posteriormente, las cajas se llevaron a incubación a 37 °C durante 24 h (LR, LP) y 30 °C durante 48 h (SB). Transcurrido el tiempo de crecimiento y utilizando un contador de colonias se hizo recuento de UFC's de acuerdo con el procedimiento indicado por la NOM-092-SSA1-1994. Todas las determinaciones se efectuaron por duplicado.

Así mismo, se elaboró una curva de calibración que correlacionara el peso seco de biomasa con el crecimiento en placa del cultivo (ver Anexo I), utilizando un cultivo axénico de LP crecido durante 48 h en medio MRS como estándar desde 0 hasta 1×10^{10} UFC mL⁻¹ de biomasa. Todas las determinaciones se efectuaron por triplicado.

2.2.3.4. Carbohidratos totales por el método de la antrona

- Basado en la técnica colorimétrica propuesta por Yemm y Willis (1954).

Esta técnica se basa en la reacción colorimétrica entre la antrona (10H-antracen-9-ona) y los carbohidratos en solución ácida, facilitando la formación de furfurales los cuales dan lugar a la formación de una mezcla de cromóforos (1,2,5 – y 1,3,5-triantronilidenopentano) de color verde-grisáceos.



La concentración del cromóforo es directamente proporcional a la concentración de carbohidratos totales en una muestra.

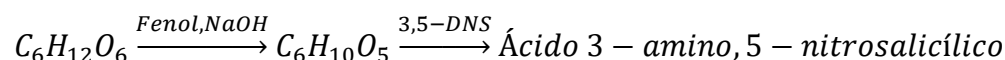
Para la cuantificación de la muestra, a la suspensión bacteriana se le efectuó un ciclo de centrifugación (10,000 rpm 5 min). A 1 mL del líquido sobrenadante conteniendo los carbohidratos disueltos se le adicionaron 2 mL de solución de antrona (0.2 % p/v en ácido sulfúrico concentrado) y se mezcló hasta homogeneidad por vortex; los tubos se dejaron reaccionar por 10 min en un baño maría con agua en ebullición para permitir el desarrollo de color. Posteriormente, se efectuaron lecturas de absorbancia en un espectrofotómetro (Thermo-Scientific Genesys 10S) a una longitud de onda de 625 nm (Yemm & Willis, 1954) ajustando a 0 de absorbancia con agua destilada tipo II en vez de la disolución de carbohidratos. Todas las determinaciones se efectuaron por duplicado.

Así mismo, se elaboró una curva de calibración que correlacionara la concentración de carbohidratos totales con la absorbancia de la muestra (ver Anexo I), utilizando una solución diluida de glucosa anhidra como estándar desde 0 hasta 10 g L⁻¹. Todas las determinaciones se efectuaron por triplicado.

2.2.3.5. Carbohidratos reductores por el método de Miller

- Basado en la técnica colorimétrica propuesta por Miller (1959).

Esta técnica se basa en la reacción colorimétrica entre el ácido 3,5-dinitrosalicílico y fenol, con los carbohidratos reductores en solución alcalina, facilitando la formación de glucuronato y potenciando el poder reductor de los carbohidratos, los cuales oxidan al 3,5-DNS a la formación de un cromóforo (ácido 3-amino,5-nitrosalicílico) de color amarillo-anaranjado.



La concentración del cromóforo es directamente proporcional a la concentración de carbohidratos reductores en una muestra.

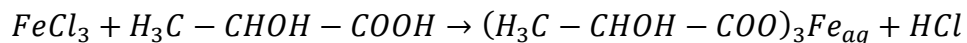
Para la cuantificación de la muestra, a la suspensión bacteriana se le efectuó un ciclo de centrifugación (10,000 rpm 5 min). A 500 µL del líquido sobrenadante conteniendo los carbohidratos disueltos se le adicionaron 1 mL de reactivo de Miller (0.63 % 3,5-DNS, 0.5 % fenol, 18.2 % sales de LaRochelle, 0.5 % bisulfito de sodio, 2.14 % NaOH, p/v, en agua destilada tipo II) y se mezcló hasta homogeneidad por vortex; los tubos se dejaron reaccionar por 10 min en un baño maría con agua en ebullición para permitir el desarrollo de color. Posteriormente, se efectuaron lecturas de absorbancia en un espectrofotómetro (Thermo-Scientific Genesys 10S) a una longitud de onda de 550 nm (Miller, 1959) ajustando a 0 de absorbancia con agua destilada tipo II en vez de la disolución de carbohidratos. Todas las determinaciones se efectuaron por duplicado.

Así mismo, se elaboró una curva de calibración que correlacionara la concentración de carbohidratos reductores con la absorbancia de la muestra (ver Anexo I), utilizando una solución diluida de glucosa anhidra como estándar desde 0 hasta 10 g L⁻¹. Todas las determinaciones se efectuaron por triplicado.

2.2.3.6. Ácido láctico por el método modificado de Borshchevskaya y colaboradores

- Basado en la técnica colorimétrica propuesta por Borshchevskaya, Gordeeva, Kalinina y Sineokii (2016).

Esta técnica se basa en la reacción colorimétrica entre el cloruro de hierro III y el ácido láctico, en el cual se forma un cromóforo (lactato de hierro) de color verde -amarillo.



La concentración del cromóforo es directamente proporcional a la concentración de ácido láctico en una muestra.

Para la cuantificación de la muestra, a la suspensión bacteriana se le efectuó un ciclo de centrifugación (10,000 rpm 5 min). A 50 µL del líquido sobrenadante conteniendo el ácido láctico se le adicionaron 2 mL de FeCl₃ (0.2 % p/v) y se mezcló hasta homogeneidad por vortex. Posteriormente, se efectuaron lecturas de absorbancia en un espectrofotómetro (Thermo-Scientific Genesys 10S) a una longitud de onda de 390 nm (Borshchevskaya, Gordeeva, Kalinina, & Sineokii, 2016) ajustando a 0 de absorbancia con agua destilada tipo II en vez de la disolución de ácido láctico. Todas las determinaciones se efectuaron por duplicado.

Así mismo, se elaboró una curva de calibración que correlacionara la concentración de ácido láctico con la absorbancia de la muestra (ver Anexo I), utilizando una solución diluida de ácido láctico (89 % pureza) como estándar desde 0 hasta 10 g L⁻¹. Todas las determinaciones se efectuaron por triplicado.

2.2.4. VIABILIDAD, DISEÑO Y OPTIMIZACIÓN DEL MEDIO DE CULTIVO MBT

2.2.4.1. DESCRIPCIÓN DEL PROCEDIMIENTO

Se inició con la elaboración de las melazas de betabel y azúcar de caña. Para ello, betabeles frescos en un estado de maduración joven (con un contenido de sólidos solubles, medidos como °Brix, de aproximadamente 2.0 ± 1.0), así como el azúcar de caña, se adquirieron en la central de abastos de la ciudad de Guadalajara. Una vez se contó con la materia prima, los betabeles fueron lavados,

sanitizados, pelados y cubcados (cubos <5 cm). Posteriormente, fueron colocados en un baño de agua hirviendo en una relación de 3:1 agua: betabel (kg: kg) por 1.5 h. Transcurrido este tiempo, los betabeles fueron molidos y, junto con el agua de cocción, se extrajo el jugo de betabel utilizando un cribado en serie con mallas del número 80 – 100. El jugo de betabel fue concentrado por evaporación atmosférica hasta lograr un contenido de sólidos solubles, medidos como ° Brix, no menor a 50 y una concentración de fuente de carbono (medida como glucosa) superior a 10 g L⁻¹ (se analizó la concentración de azúcares reductores de acuerdo con los procedimientos indicados en el apartado 1.2 de este capítulo). La mezcla, denominada melaza de betabel, se mantuvo en congelación hasta su uso.

2.2.4.2. Definición de las condiciones óptimas para la extracción de té verde

Para definir las condiciones óptimas para la extracción de té verde se generó un diseño factorial 3² (DesignExpert®, 11.0 Stat-Ease Minneapolis, MN). Los factores fueron: temperatura de extracción y concentración de sólidos de té, a un tiempo constante de extracción de 3 minutos de acuerdo con las sugerencias de uso del proveedor. El contenido de compuestos fenólicos fue la única variable de respuesta (ver apartado 2.2 de este capítulo para el procedimiento de análisis). Las corridas se prepararon en matraces Erlenmeyer de 125 mL completando un volumen final de 50 mL; los componentes del medio se pesaron de acuerdo con las distintas corridas y, adicionalmente con agua corriente para efectuar la infusión y enfriados inmediatamente a -4 °C para detener el proceso de extracción.

2.2.4.3. Optimización del medio de cultivo MBT

Para la formulación del medio optimizado con melaza de betabel (MBT) se generó un diseño de superficie de respuesta central compuesto (DesignExpert®, 11.0 Stat-Ease Minneapolis, MN). Los factores fueron: pH_i, extracto de levadura, concentración de fuente de carbono (ajustando la concentración final con azúcar de caña) y volumen de extracto de té verde, manteniendo al crecimiento celular fue la única variable de respuesta (se analizó el crecimiento de biomasa de acuerdo con los procedimientos indicados en el apartado 1.2 de este capítulo). Las 92 corridas se

prepararon en tubos cónicos estériles de 25 mL completando un volumen final de 10 mL; los componentes del medio se pesaron de acuerdo con las distintas corridas y, adicionalmente, todos los tubos contenían agua corriente para proporcionar micronutrientes. Los tubos fueron inoculados con 10 % p/v con una mezcla compuesta por 50 % p/p de LR y LP, liofilizados, respectivamente. Crecieron durante 24 h a 37 °C y 150 rpm.

2.2.4.4. Definición de las condiciones óptimas para la esterilización del medio MBT

Para evitar la degradación de los compuestos fenólicos por efecto de la esterilización del medio de cultivo, se generó un diseño factorial 3^2 (DesignExpert®, 11.0 Stat-Ease Minneapolis, MN). Los factores fueron: temperatura y tiempo de esterilización, manteniendo al contenido de compuestos fenólicos y crecimiento microbiano como variables de respuesta (ver apartados 1.2 y 2.2 de este capítulo para los procedimientos de análisis – conteo en placa y contenido fenólico, respectivamente). Las corridas se prepararon en frascos de cultivo de 100 mL completando un volumen final del medio optimizado de 50 mL y la esterilización de los medios se efectuó en autoclave (Yamato Scientific Co. SN210) operada a las distintas combinaciones de tiempo y temperatura.

2.2.4.5. Evaluación del impacto de metabolitos secundarios sobre el cometabolismo de los microorganismos probióticos

Finalmente, para evaluar el impacto de los metabolitos secundarios sobre el crecimiento de los microorganismos probióticos durante el cometabolismo en el reactor de mantenimiento, se evaluó el efecto que tenía el ácido láctico sobre el crecimiento de SB, así como el efecto del etanol sobre el crecimiento de un cultivo mixto compuesto por los dos lactobacilos, LP y LR (50 % p/v de cada uno). Las corridas experimentales (ambas desarrolladas por duplicado) se prepararon de la siguiente manera:

- Para el cultivo mixto de lactobacilos: en series de frascos de cultivo de 50 mL completando un volumen final del medio optimizado estéril de 25 mL; las series de frascos contenían etanol absoluto estéril en concentraciones de 0, 5, 10, 15 y 20 % (v/v). Las condiciones de

fermentación fueron sin control de pH, con un inóculo inicial de 10 % (v/v) de la mezcla de probióticos, en anaerobiosis e incubados a 37 °C por 24 h.

- Para el cultivo de SB: en series de matraces de 50 mL completando un volumen final del medio optimizado estéril de 25 mL; las series de frascos contenían ácido láctico estéril (pureza > 99 %) en concentraciones de 0, 5, 10, 15 y 20 % (v/v). Las condiciones de fermentación fueron sin control de pH, con un inóculo inicial de 10 % (v/v), en agitación a 250 RPM e incubados a 30 °C por 24 h.

Los factores analizados fueron para cada serie: concentración del metabolito y el crecimiento microbiano fue la variable de respuesta (ver apartados 1.2 de este capítulo para el procedimiento de análisis – conteo en placa).

2.2.5. CARACTERIZACIÓN DE LAS VARIABLES REOLÓGICAS DEL MEDIO DE CULTIVO MBT

Para conocer la reología del medio MBT una vez esterilizado y poder estandarizar los flujos de operación de las bombas de alimentación/descarga de los biorreactores operados en cultivo continuo / lote alimentado se efectuaron pruebas de viscosidad y densidad. Así mismo fueron caracterizados los flujos y condiciones de operación de las bombas peristálticas auxiliares al proceso fermentativo. Los procesos se describen a continuación:

2.2.5.1. Viscosidad por el método del viscosímetro Brookfield

- Basado en la técnica definida en la norma ASTM D6080 (2018).

Esta técnica se basa en la cuantificación de la viscosidad (en cP) por la técnica del viscosímetro de aguja para cualquier tipo de fluido a bajas temperaturas (< 40 °C).

Para la cuantificación de la muestra, 100 mL del medio MBT estéril fueron colocados en un vaso de precipitados de vidrio. Se efectuaron lecturas de viscosidad por medio de un viscosímetro Brookfield DV-II, utilizando una aguja S01 y un termopar para el registro de temperatura. El programa utilizado en el viscosímetro fue el 01, a 100 RPM; el equipo fue calibrado

a cero cP en aire. Posteriormente, se introdujo el termopar y la aguja en el vaso de precipitados conteniendo el medio MBT estéril hasta alcanzar una profundidad cercana al centro del recipiente y que cubriera el nivel mínimo indicado en la aguja. Las mediciones de viscosidad (en cP) y temperatura (en °C) se efectuaron durante un minuto, en intervalos de 15 s. Las determinaciones se efectuaron por cuadruplicado, buscando mantener un % de torque entre 10 y 90 %.

2.2.5.2. Densidad por el método del picnómetro de Bingham

- Basado en la técnica definida en la norma ASTM D1217 (2015).

Esta técnica se basa en la cuantificación de la densidad (en g mL⁻¹) por la técnica del picnómetro de Bingham para cualquier tipo de fluido.

Para la cuantificación de la muestra, un picnómetro de Bingham de 10.399 mL fue llevado a peso constante por secado en estufa a 100 °C. Una vez registrado el peso del picnómetro (por gravimetría en balanza analítica), se llenó el dispositivo hasta desborde con medio MBT estéril y se registró la temperatura del medio. Se pesó nuevamente el picnómetro, se registró el valor y por medio de la ecuación 16 se calculó la densidad del fluido. Las determinaciones se efectuaron por triplicado.

$$\rho = \frac{(PPM-PP)}{V} \quad \dots \text{Ecuación 16}$$

Donde ρ es la densidad del fluido a una temperatura constante (en g mL⁻¹), PPM es el peso del picnómetro con el medio MBT hasta desborde (en g) y PP es el peso del picnómetro vacío (en g).

2.2.5.3. Capacidad de las bombas peristálticas

Esta determinación se basa en la cuantificación del flujo de las bombas peristálticas utilizadas para llevar a cabo la alimentación/descarga de los influentes y efluentes para los biorreactores operados en cultivo continuo y lote alimentado.

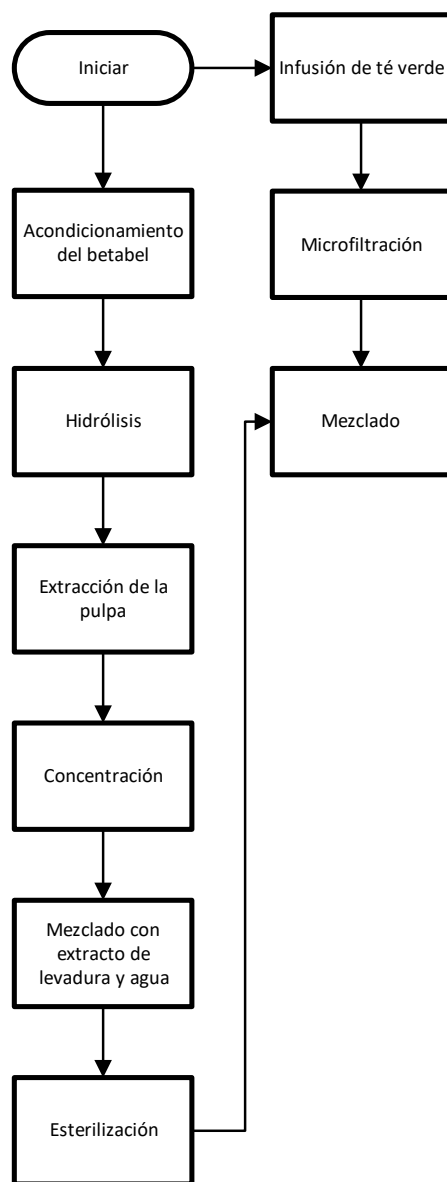
Para la cuantificación de las capacidades de las bombas, se utilizaron tres bombas Masterflex® L/S con un solo cabezal Masterflex® Easy Load II®, modelo 77201 – 62 y tubería Masterflex® de silicón del #14. Se colocaron 100 mL de medio MRS estéril en un vaso de

precipitados, en agitación a 250 RPM's y a 30 °C. Se introdujo un extremo de la tubería – previamente insertada en el cabezal de la bomba – en el vaso de precipitados mientras que el otro extremo se colocó dentro de una probeta de vidrio de 10 mL. Se operaron las bombas en porcentajes de potencia desde 5 hasta 50 %, registrando el tiempo en que tardaba en llenarse la probeta de 10 mL para calcular, por medio de la ecuación 17, el flujo de cada bomba. Las determinaciones se efectuaron por duplicado.

$$F_{\%C} = t^{-1} \quad \dots \text{Ecuación 17}$$

Donde $F_{\%C}$ es el flujo de la bomba persitáltica (en mL s⁻¹) para medio MBT, a 30 °C y pasando por tubería Masterflex® #14, y “t” es el tiempo (en s) que tardó en llenarse la probeta de 10 mL.

2.2.6. DIAGRAMA DEL PROCESO



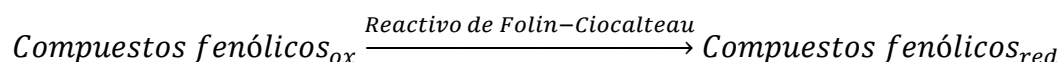
2.2.7. FUNDAMENTO DE LAS TÉCNICAS ANALÍTICAS

Las técnicas de cuantificación de biomasa por peso seco, densidad óptica, crecimiento en placa, carbohidratos totales, carbohidratos reductores y ácido láctico se efectuaron como se reportó en el apartado 1.2 de este capítulo.

2.2.7.1. Contenido fenólico total por el método de Folin-Ciocalteu

- Basado en la técnica colorimétrica propuesta por Velioğlu, Mazza, Gao y Oomah (1998).

Esta técnica se basa en la reacción REDOX entre el reactivo de Folin-Ciocalteu (complejos ácidos fosfomolibdicos y fosfotúngsticos) con los compuestos que contengan anillos bencénicos en solución alcalina, facilitando la reducción de los compuestos fenólicos y la oxidación del reactivo de Folin-Ciocalteu hasta la formación de un cromóforo (complejo fosfotúngstato/fosfomolibdato) de color azul.



La concentración del cromóforo es directamente proporcional a la concentración de compuestos fenólicos totales en una muestra.

Para la cuantificación de la muestra, a la suspensión bacteriana se le efectuó un ciclo de centrifugación (10,000 rpm 5 min). A 500 µL del líquido sobrenadante conteniendo los polifenoles disueltos se le adicionaron 1 mL de carbonato de sodio 0.7 M y 1 mL del reactivo de Folin-Ciocalteu; posteriormente se mezcló hasta homogeneidad por vortex y los tubos se dejaron reaccionar durante 20 min en obscuridad y a temperatura ambiente para permitir el desarrollo de color. Posteriormente, se efectuaron lecturas de absorbancia en un espectrofotómetro (Thermo-Scientific Genesys 10S) a una longitud de onda de 710 nm (Velioğlu, Mazza, Gao, & Oomah, 1998) ajustando a 0 de absorbancia con agua destilada tipo II en vez de la disolución de polifenólicos. Todas las determinaciones se efectuaron por duplicado.

Así mismo, se elaboró una curva de calibración que correlacionara la concentración de polifenoles totales con la absorbancia de la muestra (ver Anexo I), utilizando una solución diluida de ácido gálico (pureza > 98 %) como estándar desde 0 hasta 17 ppm. Todas las determinaciones se efectuaron por triplicado.

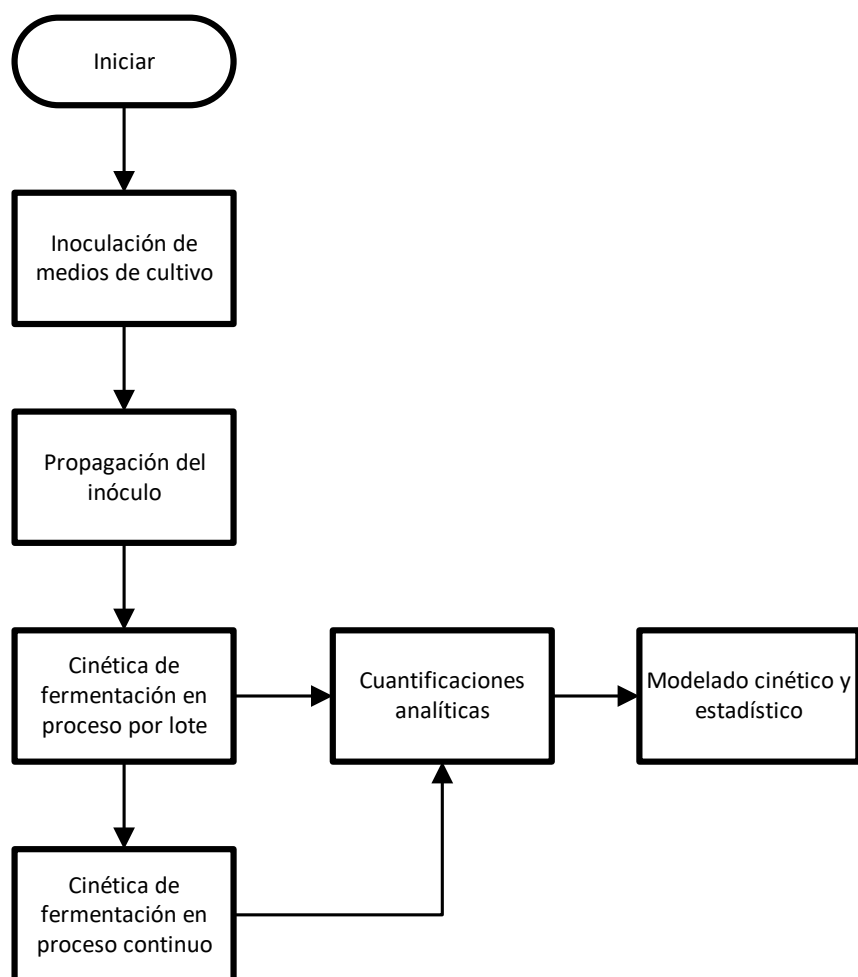
2.2.8. CARACTERIZACIÓN DE LOS PARÁMETROS CINÉTICOS DE CRECIMIENTO DE LOS TRES MICROORGANISMOS EN EL MEDIO OPTIMIZADO MBT

2.2.8.1. DESCRIPCIÓN DEL PROCEDIMIENTO

Las cepas se reactivaron utilizando la misma metodología descrita en el apartado 1.1 de este capítulo. Los medios de precultivo se inocularon con 5 % (p/v) de células liofilizadas y se incubaron mediante pases sucesivos (24 h – 12 h) a 37 °C en agitación orbital (150 rpm) hasta lograr una concentración celular de 10^5 UFC mL⁻¹. Posteriormente se llevaron a cabo los cultivos por lote, continuos y, finalmente, lote alimentado; los dos primeros tipos de cultivo se realizaron por triplicado utilizando biorreactores Applikon My-Control® (en medio MBT para los tres microorganismos) en condiciones de operación para LP y LR: $V_{OP} = 200$ mL, $pHi = 6.5 \pm 0.2$ sin control, 250 rpm, 37 ± 0.5 °C, $O_2 > 5$ %, $x_0 = 10$ % v/v y en condiciones de operación para SB: $V_{OP} = 200$ mL, $pHi = 6.5 \pm 0.2$ sin control, 250 rpm, 30 ± 0.5 °C, $O_2 > 20$ %, $x_0 = 10$ % v/v. La duración de los cultivos por lote fue de 24 h con una frecuencia de muestreo de 2 h, las cuales fueron extraídas en condiciones de esterilidad, centrifugadas a 10,000 rpm, 5 min, para separar el paquete celular y, posteriormente, mantenidas en refrigeración hasta su análisis fisicoquímico y microbiológico. Los cultivos continuos se operaron por lote hasta llegar a la etapa exponencial de crecimiento de los microorganismos; una vez alcanzado, los biorreactores se operaron en cultivo continuo a flujo constante de 0.037 L h⁻¹ durante 12 h con una frecuencia de muestreo de 1 h, las cuales fueron extraídas en condiciones de esterilidad, centrifugadas a 10,000 rpm, 5 min, para separar el paquete celular y, posteriormente, mantenidas en refrigeración hasta su análisis fisicoquímico y microbiológico. A las muestras acondicionadas se les analizaron biomasa por crecimiento y conteo en placa correlacionada con peso seco, carbohidratos totales por el método de la antrona, carbohidratos reductores por el método de Miller, ácido láctico por el método modificado de Borshchevskaya y contenido fenólico total por el método de Folin-Ciocalteu. El CCLA consistía en dos biorreactores operados en cultivo continuo – uno para mezcla inicial de 50 % p/v de LP y LR y otro para SB, en las mismas condiciones de operación descritas previamente para los cultivos por lote y continuos. Los reactores se operaron en régimen por lote hasta alcanzar el estado exponencial de crecimiento; entonces se modificó su configuración a cultivo continuo, operados con un flujo de 0.02 L h⁻¹; los efluentes de los reactores convergían en un biorreactor de

mantenimiento, Applikon My-Control®, así como un influente a 0.037 L h^{-1} de medio MBT estéril. Las condiciones de operación fueron: $V_i = 2 \text{ L}$, $\text{pHi} = 6.5 \pm 1.0$, 250 rpm , $30 \pm 5.0 \text{ }^\circ\text{C}$, $\text{O}_2 > 20 \%$. La duración del cultivo por lote alimentado fue de 48 h con una frecuencia de muestreo de 2 h , las cuales fueron extraídas en condiciones de esterilidad, centrifugadas a $10,000 \text{ rpm}$, 5 min , para separar el paquete celular y, posteriormente, mantenidas en refrigeración hasta su análisis fisicoquímico y microbiológico. A las muestras acondicionadas se les analizaron biomasa por crecimiento y conteo en placa correlacionada con peso seco, carbohidratos totales por el método de la antrona, carbohidratos reductores por el método de Miller, ácido láctico por el método modificado de Borshchevskaya y contenido fenólico total por el método de Folin-Ciocalteu.

2.2.8.2. DIAGRAMA DEL PROCESO



2.2.8.3. FUNDAMENTO DE LAS TÉCNICAS ANALÍTICAS

Las técnicas de cuantificación de biomasa por peso seco, densidad óptica, crecimiento en placa, carbohidratos totales, carbohidratos reductores y ácido láctico se efectuaron como se reportó en el apartado 1.2 de este capítulo. La técnica de contenido fenólico se efectuó como se reportó en el apartado 2.2 de este capítulo.

2.3. ANÁLISIS

2.3.1. EVALUACIÓN DE LAS CINÉTICAS DE CRECIMIENTO DE LOS MICROORGANISMOS PROBIÓTICOS EN CULTIVOS MIXTOS

2.3.1.1. Definición de los parámetros cinéticos en cultivos por lote y medios comerciales

Se analizaron los datos cinéticos de crecimiento de biomasa (g L^{-1}) en función del tiempo de fermentación de las corridas efectuadas en biorreactor de 0.25 L, en cultivo por lote, con medios comerciales MRS y YPD; los datos se sometieron a una prueba de normalidad y se utilizaron los valores promedio (de tres determinaciones) para su tratamiento. Posteriormente, éstos fueron modelados utilizando CurveExpert Professional® 2.6 para definir el mejor modelo matemático que representara la función de crecimiento microbiano. Una vez definidos los mejores modelos de análisis, los datos fueron convertidos a velocidades específicas de crecimiento μ (h^{-1}) a partir del método de las pendientes, utilizando la ecuación 18:

$$\mu = \frac{\Delta x}{\Delta t} \quad \dots \text{Ecuación 18}$$

Donde μ es la velocidad específica de crecimiento de cada microorganismo en h^{-1} , Δx es la generación de biomasa probiótica, en g L^{-1} y Δt es el intervalo de tiempo de crecimiento, en h. Así mismo, se efectuaron regresiones no lineales en Minitab®18, al establecer una función con sustrato residual en el proceso (g L^{-1}). A partir de la linealización de cada función fue posible calcular las velocidades específicas de crecimiento máximas $\mu_{\text{máx}}$ (h^{-1}), para cada microorganismo, a partir de la ecuación 19:

$$\mu_{\text{máx}} = b^{-1} \quad \dots \text{Ecuación 19}$$

Donde $\mu_{\text{máx}}$ es la velocidad específica de crecimiento de cada microorganismo en h^{-1} y b es la ordenada al origen encontrada en cada modelo linealizado. De igual manera, la constante de afinidad por el substrato K_s fue calculada por medio de la ecuación 20:

$$K_s = \mu_{\text{máx}} * m \quad \dots \text{Ecuación 20}$$

Donde K_s es la constante de afinidad por el substrato en g L^{-1} , $\mu_{\text{máx}}$ es la velocidad específica de crecimiento de cada microorganismo en h^{-1} y m es la pendiente de la recta encontrada en cada modelo linealizado.

2.3.1.2. Evaluación de los parámetros cinéticos en cultivos por lote en medio MBT

Se analizaron los datos cinéticos de crecimiento de biomasa (g L^{-1}) en función del tiempo de fermentación de las corridas efectuadas en biorreactor de 0.25 L, en cultivo por lote, con medio MBT; los datos se sometieron a una prueba de normalidad y se utilizaron los valores promedio (de tres determinaciones) para su tratamiento. Posteriormente, éstos fueron modelados utilizando CurveExpert Professional® 2.6 para definir el mejor modelo matemático que representara la función de crecimiento microbiano. Una vez definidos los mejores modelos de análisis, los datos fueron convertidos a velocidades específicas de crecimiento μ (h^{-1}) a partir del método de las pendientes. Así mismo, se efectuaron regresiones no lineales en Minitab®18, al establecer una función con substrato residual en el proceso (g L^{-1}). A partir de la linealización de cada función fue posible calcular las velocidades específicas de crecimiento máximas $\mu_{\text{máx}}$ (h^{-1}), para cada microorganismo.

2.3.1.3. Evaluación de los bioprocesos en cultivos por lote, continuo y lote alimentado en medio MBT y su comparación contra los bioprocesos en medios comerciales

Se analizaron los datos cinéticos de crecimiento de biomasa (g L^{-1}) y contenido fenólico residual (ppm) una vez alcanzado el estado estacionario de las fermentaciones efectuadas en los biorreactores de 0.25 L para cultivos por lote y cultivos continuos, y en biorreactor de 7 L para

cultivo por lote alimentado, todos con medio MBT y fueron comparados contra los bioprocesos por lote efectuados en medios comerciales en las mismas condiciones descritas anteriormente:

- Para la definición de la capacidad de cada uno de los bioprocesos (C_p y C_{pk}), se utilizó la variable crecimiento celular ($g\ L^{-1}$) como variable de respuesta. Utilizando Minitab® 18 se analizaron las corridas cinéticas para definir los estadísticos descriptivos de cada bioproceso. Los límites de control se establecieron con base en una variación de no más de 2 desviaciones estándar respecto a la media de cada serie. Posteriormente, los datos fueron graficados utilizando gráficos de individuales y medias móviles (I-MR) para poder definir la capacidad del proceso y el nivel sigma de cada uno de ellos.
- Utilizando un análisis de varianza (ANOVA), los diferentes bioprocesos fueron analizados con un nivel de significancia del 5 % para identificar la existencia de diferencias significativas entre ellos. El análisis se efectuó por medio de Minitab® 18. El planteamiento de las hipótesis fue:
 - H_0 : No hay diferencias significativas entre las medias de los 4 distintos bioprocesos ($\mu_1 = \mu_2 = \mu_3 = \mu_4$).
 - H_1 : Existen diferencias significativas entre las medias de, al menos, uno de los 4 distintos bioprocesos ($\mu_1 \neq \mu_2 \neq \mu_3 \neq \mu_4$).

Se hicieron, además, comparaciones entre grupos utilizando las pruebas de Tuckey y Fischer para establecer el mejor bioproceso.

- Se evaluó la remanencia de compuestos fenólicos en cada uno de los bioprocesos por medio de un análisis de series de tiempo

CAPÍTULO VI
RESULTADOS Y DISCUSIÓN

1. IMPLEMENTACIÓN DE LA METODOLOGÍA LEAN

1.1. AJUSTE DEL DIAGRAMA DE FLUJO DEL PROCESO

Cada una de las actividades del proceso se llevó a cabo, al menos, por triplicado, con lo cual fue posible medir los tiempos de proceso y estandarizar la operación. En el proceso estandarizado para la producción a nivel piloto (7 L), se identificaron tres actividades cuello de botella que podían desarrollarse en paralelo: 1) se integraron las actividades de extracción de té verde con la elaboración de melazas, resultando en una gran actividad global definida como elaboración de medio MBT, y su caracterización fisicoquímica; 2) se redujo el tiempo no efectivo durante el precultivo al integrar las actividades de preparación de los reactores semilla dentro de una sola gran actividad; 3) se efectuó la caracterización en tiempo real de los productos de fermentación, reduciendo el tiempo no efectivo durante eliminando así el tiempo de espera de la fermentación y eficientizando el proceso. Con base en estas mejoras, se definió el nuevo diagrama de flujo, el cual se muestra en la figura 16. Se aprecia una reducción de 4 actividades, 2 etapas de valor agregado y 2 puntos de inspección, lo que representa una reducción en tiempos de operación 109.00 a 103.17 h, lo que representa una mejora de 5.35 % con respecto al proceso original.






Proceso observado:		Producción de probióticos por CCLA a escala laboratorio (7 L)										
ACTIVIDADES		PROCESO					CARACTERÍSTICAS DE LA ACTIVIDAD					
Paso	Actividades						V.A.	P.C.	Otros	Frecuen- cia	Tiempo [h]	Costo [MXN/lote]
1	Recepción de materias primas			●					x	1	0.17 ± 0.08	1.00
2	Inspección de materias primas		●	●				x		1	0.17 ± 0.08	1.00
3	Acondicionamiento de materias primas	●					x			1	1.50 ± 0.17	41.52
4	Elaboración de medio MBT	●					x			1	5.00 ± 0.33	1923.64
5	Caracterización de medio MBT		●					x		1		228.6
6	Precultivos y acondicionamiento de MO's	●					x			1	72.00 ± 0.50	264.35
7	Acondicionamiento de reactores	●					x			1		178.86
8	Esterilización de reactores con medio MBT	●					x			1		189.66
9	Inoculación de reactores	●					x			1		13.20
10	Fermentación en CCLA		●	●				x		1	24 ± 2.25	3697.16
11	Caracterización de productos de fermentación	●					x			1		228.60
12	Cosecha de biomasa	●		●			x		x	1	0.33 ± 0.17	178.38
TOTALES		8	3	2	0	0	8	3	2	12	103.17	6945.96

Figura 16: Diagrama de flujo del proceso de producción de probióticos por CCLA a escala piloto (7 L). (●) proceso de valor agregado, (■) proceso de inspección, (➡) proceso de transporte, (▷) proceso de demora, (◇) proceso de decisión; V.A. valor agregado; P.C. proceso de control.

Así mismo, en el diagrama se muestran los mejores tiempos repetibles, considerados como tiempos medios de cada operación, con su desviación estándar; así mismo, se incluyó un análisis de aproximado de costos de cada etapa (con base en los insumos y consumibles de cada operación, sin contar costos de mano de obra), con un costo total por lote (aproximado) de \$ 6945.96 MXN.

1.2.DEFINICIÓN DE LA DEMANDA Y NECESIDADES DEL CLIENTE

1.2.1. DESPLIEGUE DE LA FUNCIÓN DE CALIDAD

En la figura 17 se muestra el despliegue de la función de calidad resultante de las encuestas de satisfacción efectuadas a 77 personas. Como se aprecia en la figura, se identificaron 7 requerimientos generales de los encuestados con respecto a los productos probióticos, los cuales se muestran ponderadas (en porcentaje) en la figura 17 a manera de gráfico de pastel.

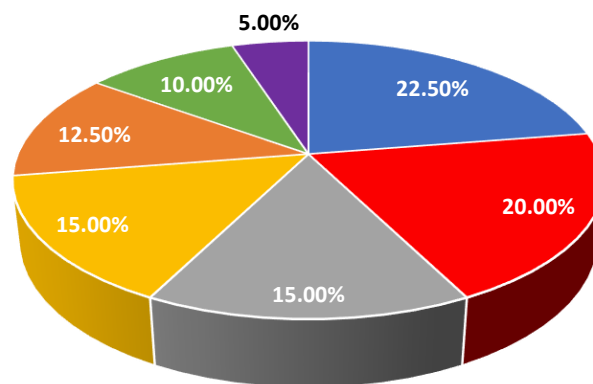


Figura 17: Gráfico de pastel donde se muestra la distribución ponderada de los requerimientos detectados por 77 consumidores encuestados con respecto a sus preferencias de consumo de productos probióticos. ■ impacto positivo en la salud, ■ costo accesible, ■ variedad de presentaciones de consumo, ■ variedad de puntos de venta, ■ información acerca de sus efectos, ■ vida de anaquel extendida, ■ aval por centros de investigación

Adicionalmente, fue posible identificar cuatro grandes grupos de competidores y la percepción que los consumidores tuvieron de ellos en cada uno de los requerimientos identificados con anterioridad; debido a la variedad de marcas que los consumidores pudieron identificar, se hicieron agrupaciones en función del sector donde pertenecen: suplementos, bebidas, alimentos lácteos y otros tipos de alimentos. Con respecto al impacto positivo a la salud, los consumidores

consideraron a los alimentos pertenecientes al sector de bebidas los más significativos; la cuestión de costos del producto, información acerca de éste y la variedad de sitios de venta presentó un empate con los alimentos bebibles y aquellos a base de leche; los alimentos lácteos también fueron considerados como aquellos con mayor variedad de presentaciones de consumo; tanto bebidas, alimentos a base de leche y los suplementos solos fueron bien recibidos como avalados por centros de investigación. A partir de estos resultados, como se muestra en el gráfico de frecuencias acumuladas (figura 18), el sector de alimentos lácteos es el que tiene una mejor percepción por parte del público general, con una frecuencia acumulada de 26, seguido del sector de bebidas, el de suplementos y, finalmente, otros tipos de alimentos adicionados con productos probióticos. Se corrió un análisis de varianza ($\alpha=0.05$) con Minitab® 18 comparando los cuatro sectores y no se encontraron diferencias significativas entre ellos ($F=2.53$, $P=0.081$) lo cual es un indicador de colocación del producto terminado en el mercado, es decir, un producto nuevo puede ser colocado con buena percepción por parte del público general, sin embargo, el mejor sector es, sin dudas, el sector de lácteos.

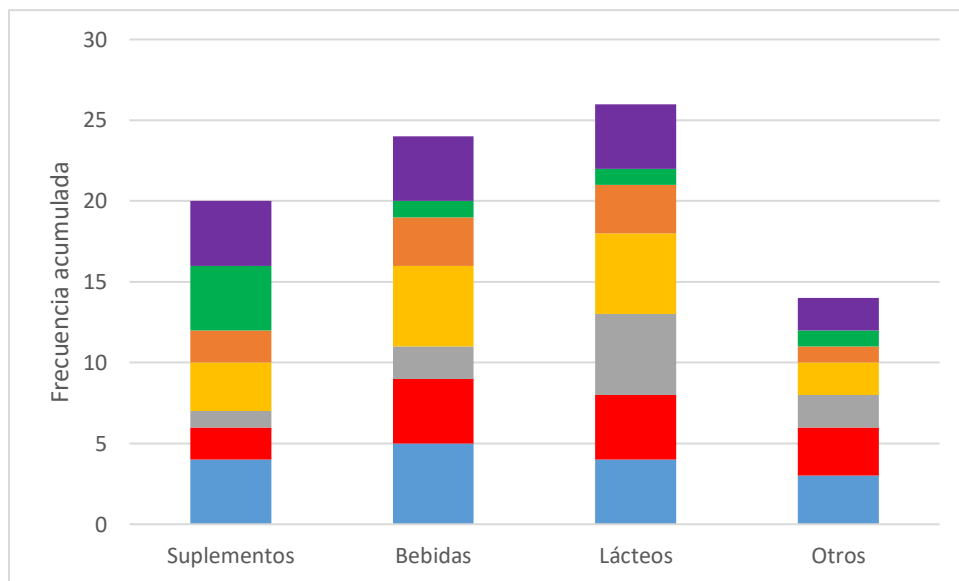


Figura 18: Gráfico de barras donde se muestra la frecuencia acumulada de las necesidades detectadas por 77 consumidores agrupadas en 4 sectores de consumo de productos probióticos. ■ impacto positivo en la salud, ■ costo accesible, ■ variedad de presentaciones de consumo, ■ variedad de puntos de venta, ■ información acerca de sus efectos, ■ vida de anaquel extendida, ■ aval por centros de investigación

Con base en los requerimientos de los clientes, por medio de una tormenta de ideas, se establecieron los requerimientos técnicos para su logro; de manera gráfica se plasmaron en un diagrama de causa-

raíz utilizando Minitab® 18, el cual se aprecia en la figura 19 para posteriormente generar las relaciones entre cada uno de los requerimientos y poder definir la importancia de cada criterio.

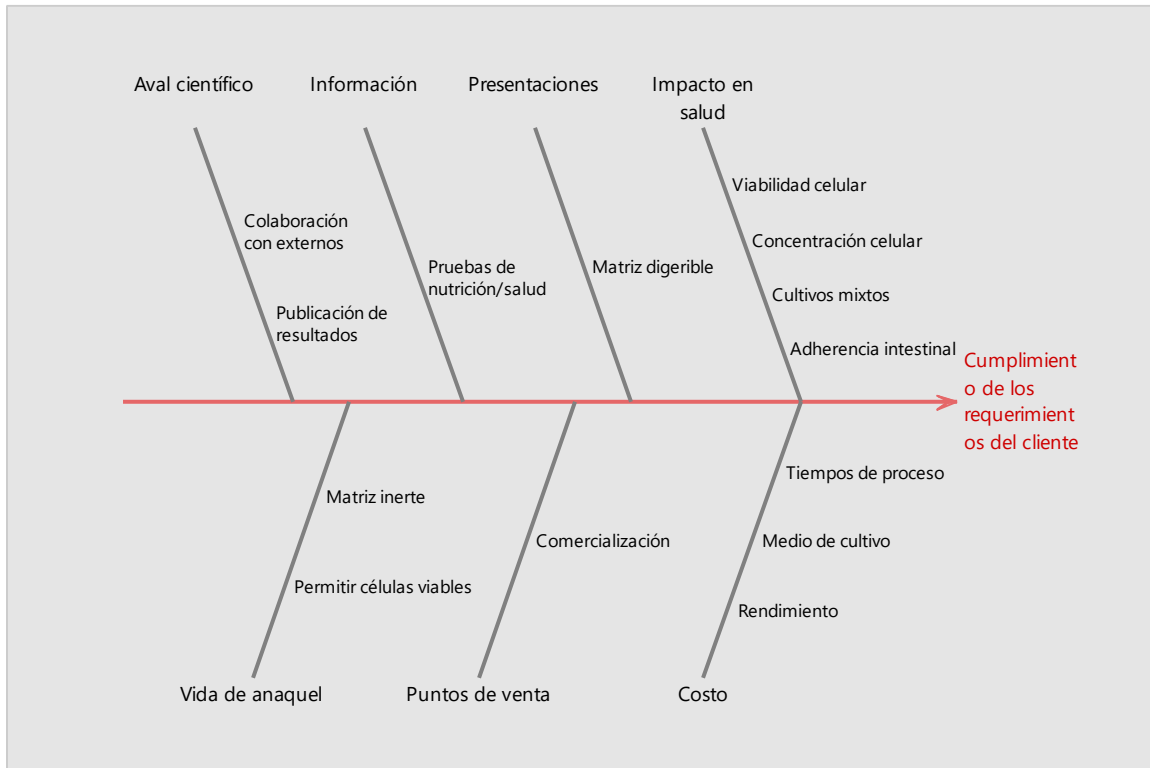


Figura 19: Diagrama de causa-raz de las relaciones entre los requerimientos del cliente con los requerimientos técnicos del proceso de producción de microorganismos probióticos

Las relaciones se ponderaron asignando un valor de 9 a las relaciones fuertes positivas, 3 a las relaciones positivas, 0 cuando no había relación, -3 a las relaciones negativas y -9 a las relaciones fuertes negativas. Con base en estos resultados, se desarrolló un diagrama de Pareto para la identificación de las causas técnicas que representan el 80 % de los retos tecnológicos del proyecto. El diagrama, elaborado utilizando Minitab® 18 se muestra en la figura 20:

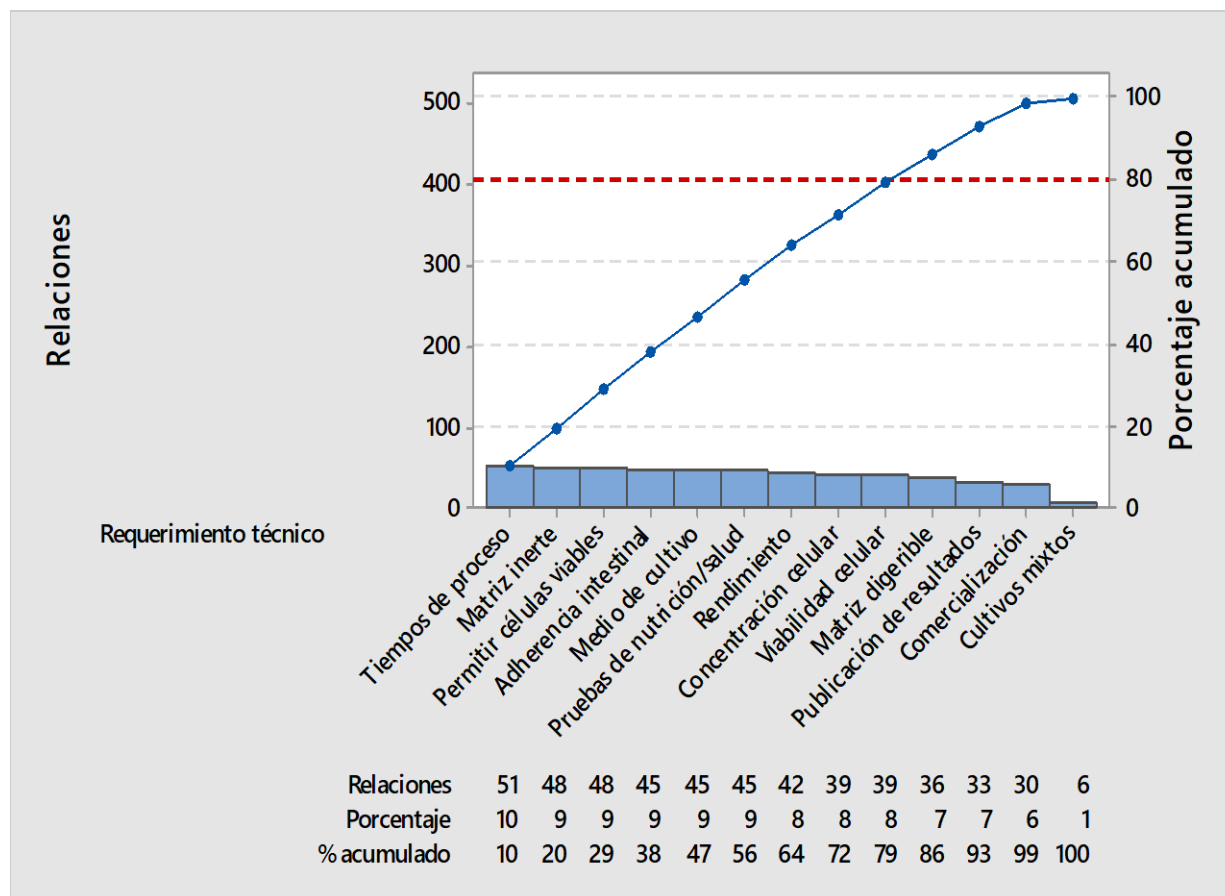


Figura 20: Diagrama de Pareto de las relaciones entre los requerimientos técnicos del proceso de producción de microorganismos probióticos

Se aprecia que el principal contribuyente a los retos tecnológicos del proceso es el tiempo de producción, siendo importantes también que la matriz donde se comercialicen sea inerte y que permita su viabilidad celular, la adherencia intestinal, el medio de cultivo, los resultados de las pruebas de nutrición / salud, el rendimiento, la viabilidad celular después del proceso y la concentración celular, sumando entre ellas 79.29 % de la contribución de retos.

Finalmente, se calcularon las ponderaciones de los requerimientos técnicos en función de los de los requerimientos del cliente para definir los requerimientos del proceso a atacar. El análisis se efectuó por medio de un diagrama de Pareto para la identificación de las ponderaciones clave por atacar que representan el 80 % de la contribución de retos en importancia del proyecto. El diagrama, elaborado utilizando Minitab® 18 se muestra en la figura 21:

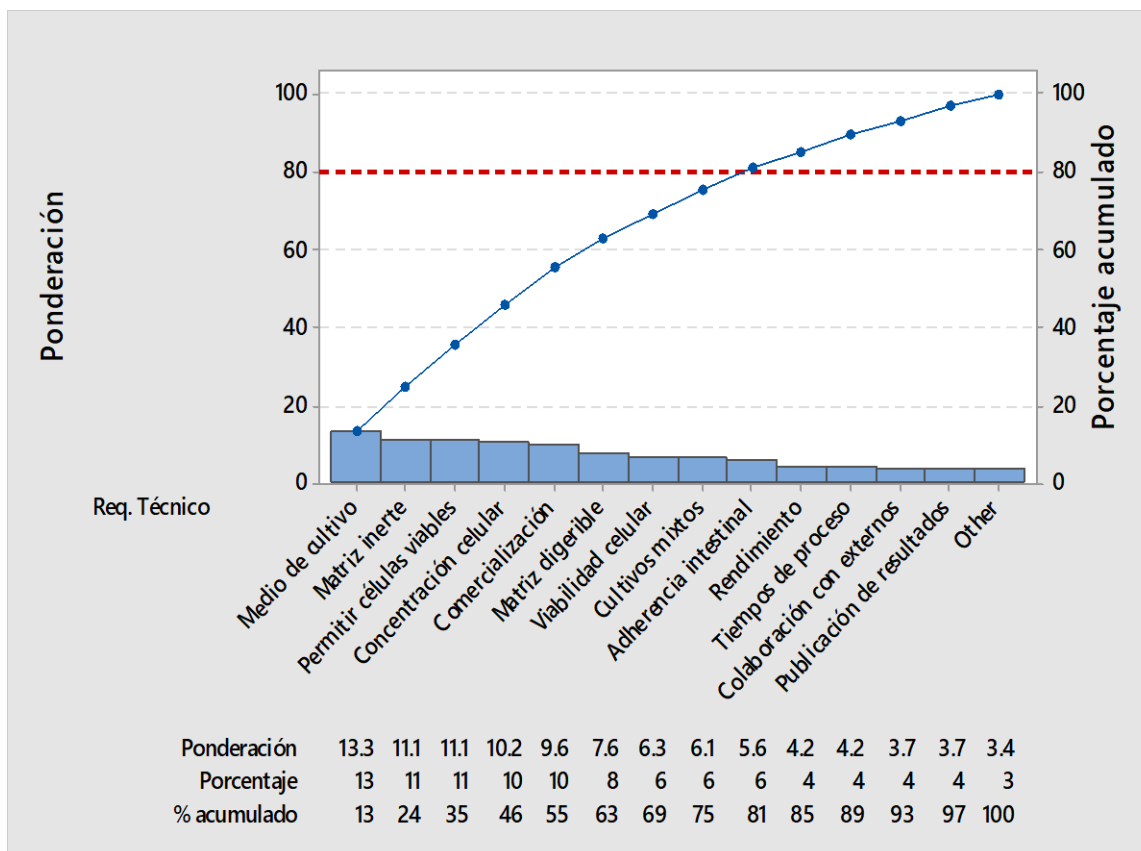


Figura 21: Diagrama de Pareto de las relaciones entre las ponderaciones entre los requerimientos técnicos del proceso de producción de microorganismos probióticos en función de los requerimientos del cliente

Se aprecia que el principal contribuyente en ponderación e importancia del proceso es el medio de cultivo, seguido de una matriz de comercialización que sea inerte y que permita la viabilidad de los probióticos, así como las concentraciones celulares, la estrategia de comercialización, la digestibilidad de los probióticos y el uso de un cultivo mixto sumando entre ellas 75.22 % de la contribución a la problemática del proceso. Con base en estos resultados fue que se optó por enfocar el objeto de estudio del proyecto en el medio de cultivo ya que fue el principal contribuyente en importancia (13.29 %) para lograr la optimización del proceso, atacando, dentro de los alcances del proyecto, los parámetros del proceso que sí eran controlables.

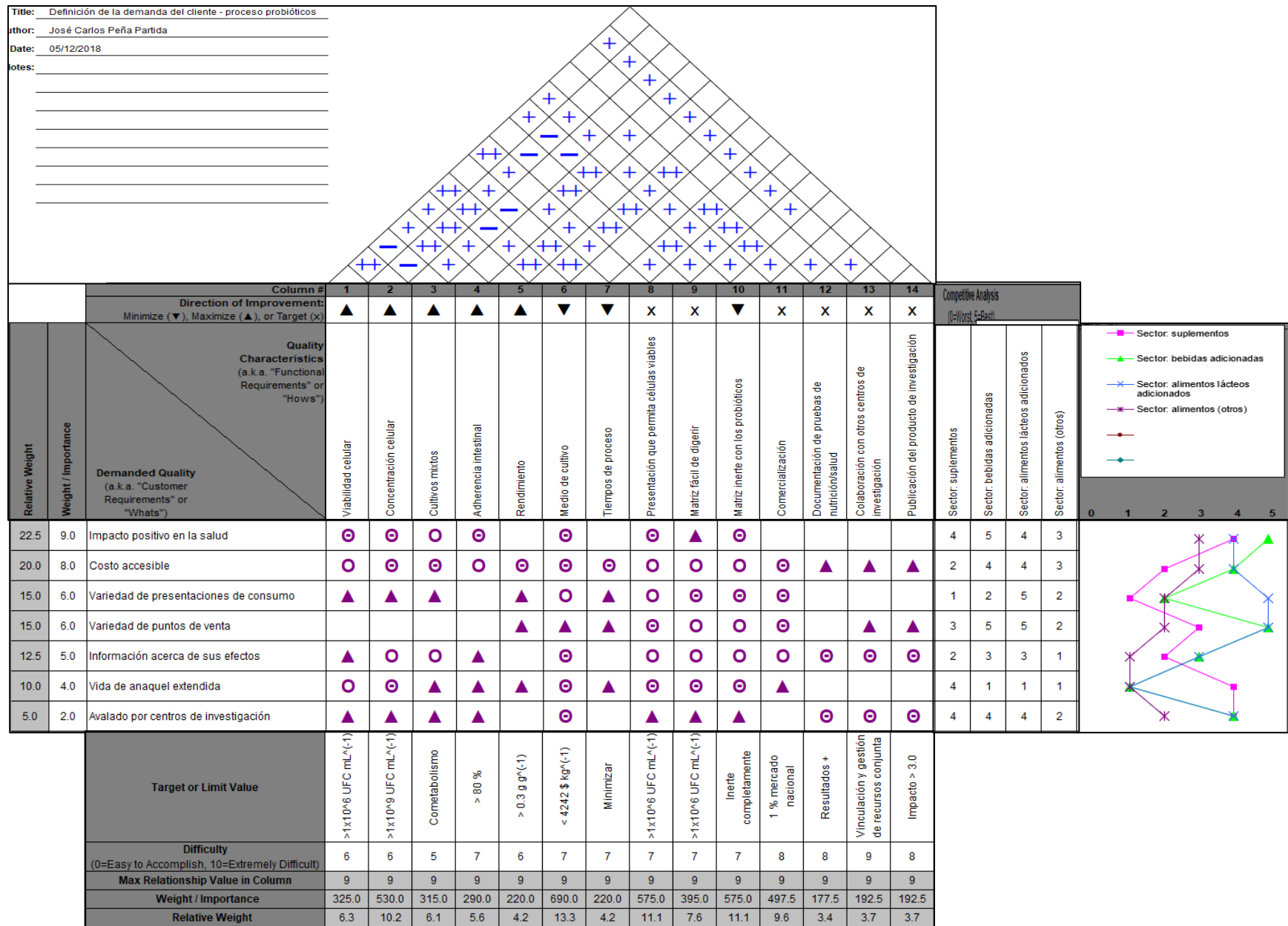


Figura 22: QFD para la definición de la demanda de probióticos.

1.3. MAPEO DE LA CADENA DE VALOR (VSM)

A partir de la información recabada durante el escalamiento a nivel piloto fue posible desarrollar un mapeo de cadena de valor (VSM) de estado ideal donde se describió el flujo de actividades primarias (incluyendo las tres etapas del proceso de producción de microorganismos probióticos en CCLA) y secundarias (con base en la logística de suministro y compra de los departamentos DPTI y Compras de ITESO). Como se aprecia en la figura 23, los tiempos de valor agregado para el proceso primario resultaron de 0.8 días, mientras los de valor no agregado de 44 días el FPY fue de 0.62%, con una confiabilidad de 99%.

1.4. CÁLCULO DEL TAKT-TIME

Con base en el proceso primario descrito en el VSM y generado a partir del diagrama de flujo ajustado al CCLA escalado a biorreactor de 7 L fue posible calcular el *Takt-time* del proceso, resultando de 1.7142 h bajo las consideraciones descritas en apartados anteriores; con base en este cálculo, así mismo se hizo un balance de cargas de trabajo, el cual se muestra en la figura 16. Con base en este valor fue posible calcular el *pitch* del proceso resultando de 12 h netas bajo las mismas consideraciones descritas anteriormente, para el cálculo del *Takt-time*. El resultado de los tiempos de ciclo por actividad/operador, el *Takt-time* y el *pitch* se muestran en la figura 24.

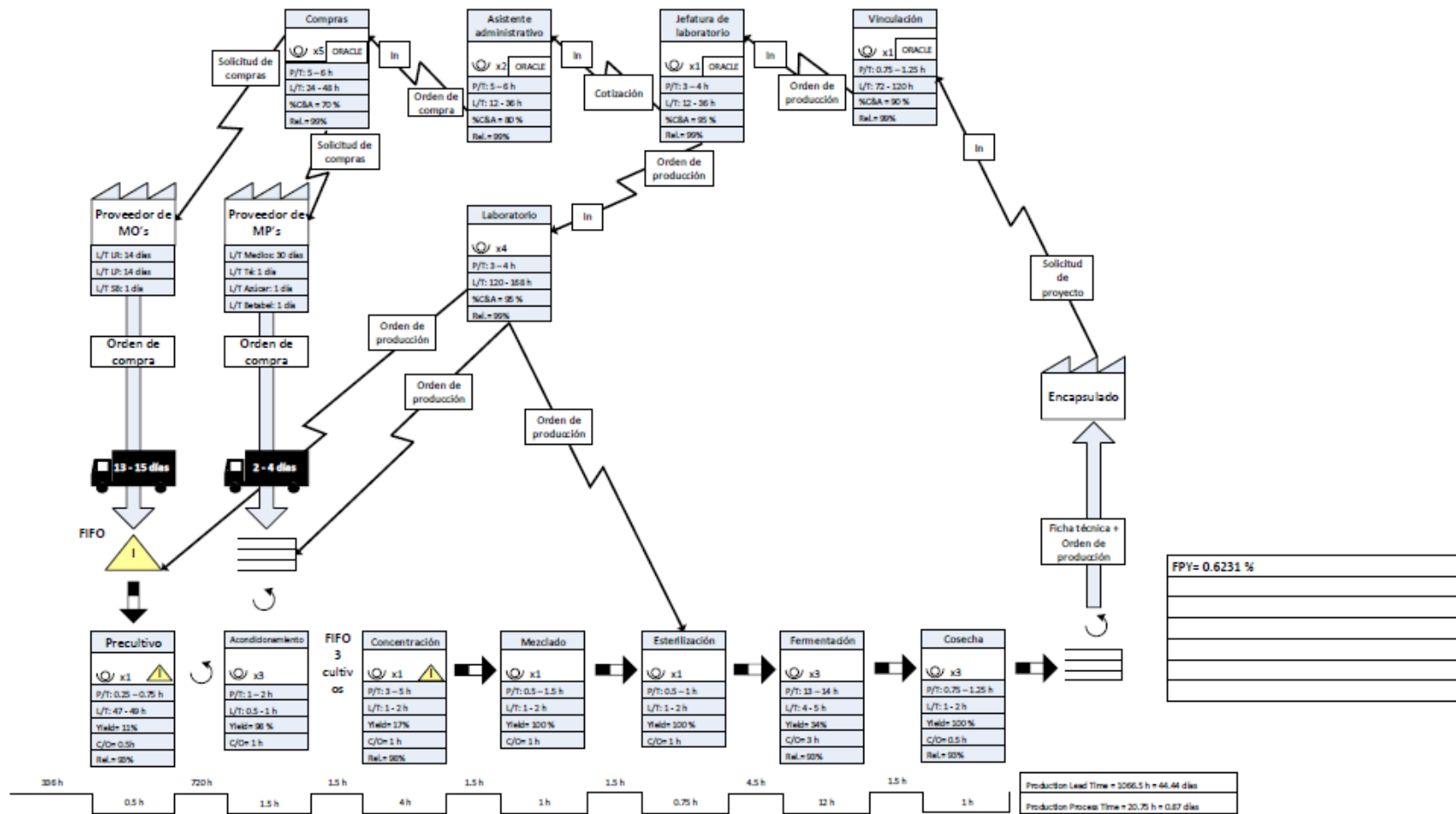


Figura 23: Mapeo de la cadena de valor (VSM) del proceso de producción de probióticos por CCLA para biorreactor de 7 L

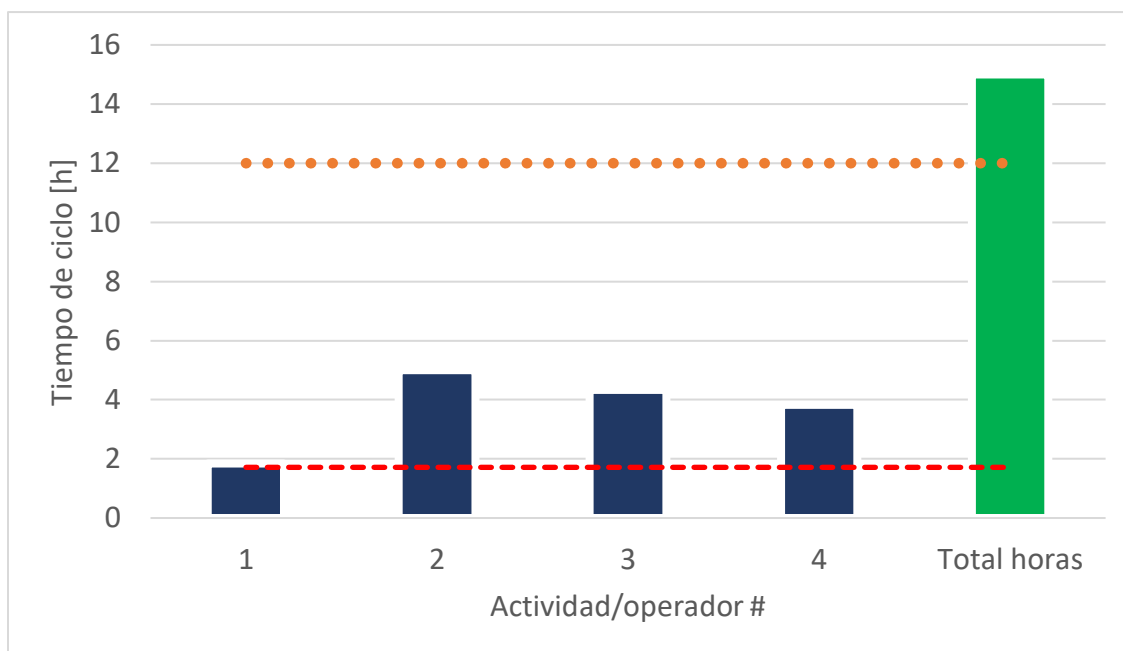


Figura 24: Tiempo de ciclo por actividad/operador y totales de horas efectivas para el proceso de producción de probióticos por CCLA en biorreactor de 7 L. Se muestra el Takt-time (■) de 1.72 h, así como el pitch. (◆) de 12 h.

1.5. FLUJO CONTINUO DEL PROCESO

1.5.1.1. IMPLEMENTACIÓN DE LAS 5'S

El resultado del diagnóstico de la auditoría de 5's antes de la implementación se muestra en el cuadro 2. Se aprecia que para ninguna categoría se tuvo un valor inicial superior a 2, lo cual representa que en ninguna categoría había una implementación real de reducción de desperdicios o estandarización. Esto queda claramente visible al hacer la suma del puntaje total del cuestionario, de 7, lo que representa sólo 28 % de implementación de la estrategia. Con base en estas observaciones, rubro por rubro, se procedió a implementar 5's para todas las etapas del proceso de producción de probióticos por CCLA en biorreactor de 7 L.

Cuadro 2: Diagnóstico inicial de reducción de desperdicios y estandarización por auditoría de 5's para el proceso de producción de probióticos.

CATEGORÍA	PUNTAJE	DIAGNÓSTICO
1. <i>Seiri</i> (Seleccionar)	2	Se han removido los objetos innecesarios del proceso. No existen más de 6 violaciones de selección en el área de trabajo.
2. <i>Seiton</i> (Ordenar)	1	Todos los objetos necesarios están presentes, no es difícil determinar su uso. No existen más de 8 violaciones de orden en el área de trabajo.
3. <i>Seiso</i> (Limpieza)	2	Se ha implementado una limpieza inicial tanto en equipo como área de trabajo. No existen más de 6 violaciones de limpieza en el área de trabajo.
4. <i>Seiketsu</i> (Estandarizar)	1	Existen estándares de 5's para las primeras tres categorías con puntajes superiores a 1, en cada una. No existen más de 8 violaciones de estandarización en el área de trabajo.
5. <i>Shitsuki</i> (Disciplina)	1	25 % de los operadores en el área de trabajo (en todos los turnos) han sido entrenados en 5's. Cada una de las primeras cuatro categorías cuentan con puntajes superiores a 1. No existen más de 8 violaciones de disciplina en el área de trabajo.

La descripción de la implementación en cada etapa se muestra a continuación:

1.5.1.2. SEIRI (SELECCIONAR) Y SEITON (ORDENAR)

Se inició separando los componentes del proceso para cada una de las cuatro grandes actividades establecidas en el diagrama de flujo del proceso optimizado para el bioproceso a nivel piloto de 7 L y hacer un recuento de sólo aquellos que sí participan directamente en las etapas de cada actividad. Para fortalecer la implementación de la selección de materiales, se hizo un listado de sólo aquellos que son necesarios para cada etapa de proceso. Para la implementación de la etapa de orden, se colocaron ayudas visuales para cada etapa del proceso de fabricación y facilitar la ubicación de las herramientas; así mismo, se hizo un manual de proceso donde se describe, secuencialmente, las actividades a realizar para cada actividad. Las evidencias de implementación se pueden observar en la figura 25; en ellas se aprecia una clara reducción de materiales innecesarios, así como una mejor disposición de los recursos necesarios para llevar a cabo las actividades de cada etapa del proceso, principalmente para la etapa de elaboración del medio de cultivo MBT.

1.5.1.3. SEISO (LIMPIEZA)

Se analizaron las acciones necesarias para estandarizar y llevar a cabo la limpieza para cada una de las cuatro grandes actividades establecidas en el diagrama de flujo del proceso optimizado para el bioproceso a nivel piloto de 7 L, desglosadas en subprocesos individuales para establecer las acciones necesarias, así como los insumos, frecuencias de limpieza, responsables de la ejecución y de la verificación del proceso. El formato utilizado se muestra en la figura 26, el cual se pretende se utilice como base para, durante el escalamiento al proceso industrial, definir los POES del proceso.

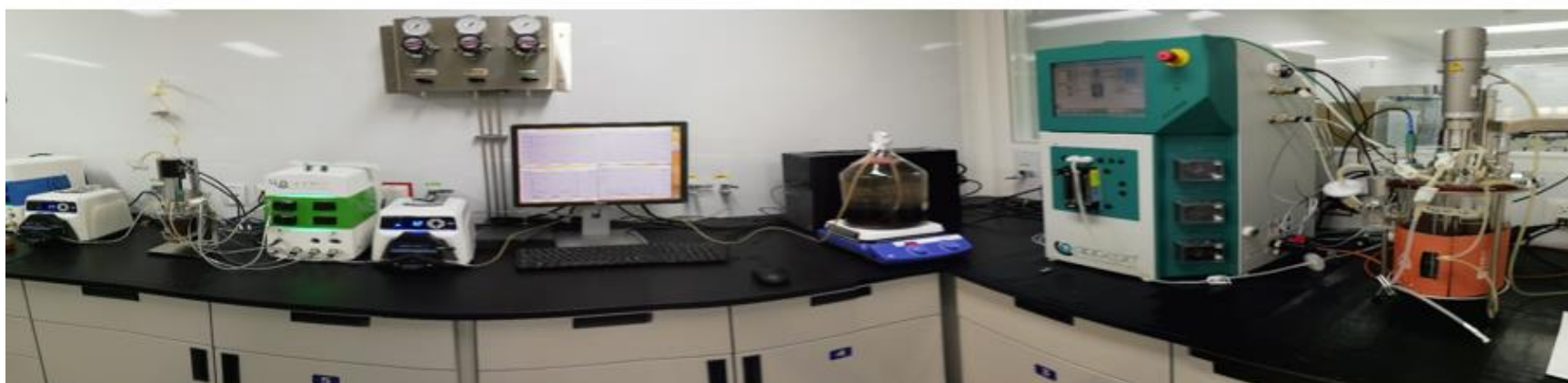


Figura 25: Evidencias de implementación de Seiri (seleccionar) para el proceso de producción de probióticos por CCLA en biorreactor de 7 L. A la izquierda se muestra el listado de componentes del biorreactor Applikon® (0.25L). A la derecha, el Biorreactor Applikon® (0.25L) con medio MBT para cultivo por lote. Debajo, Sistema de biorreactores Applikon® (0.25L, 7 L) en CCLA con medio MBT.

Lista de verificación de limpieza						
Actividad	Subproceso	Acciones de limpieza	Implementos de limpieza	Frecuencia	Responsable	Verifica
1. Elaboración de medio de cultivo	Recepción e inspección de materias primas	1. Limpieza y sanitización de utensilios	Guantes de plástico Detergente grado alimenticio Sanitizante grado alimenticio	1 por lote	Operador 1	Supervisor del proceso
	Acondicionamiento de materias primas	1. Limpieza y sanitización de utensilios 2. Lavado y sanitización de materias primas 3. Lavado de utensilios	Guantes de plástico Escobillones de cerda dura Detergente grado alimenticio Sanitizante grado alimenticio	1 por lote		
	Preparación del medio MBT	1. Limpieza y sanitización de utensilios 2. Lavado y sanitización de equipo de procesamiento 3. Lavado de utensilios y equipo de procesamiento	Guantes de plástico Escobillones de cerda dura Detergente grado alimenticio	1 por lote		
	Caracterización del medio MBT	1. Limpieza y sanitización de zona de trabajo 2. Lavado de equipo de trabajo	Guantes de plástico Escobillones de cerda suave Detergente grado analítico Etanol 96 ° Agua destilada	1 por lote		
2. Preparación del preinóculo	Activación de las cepas	1. Limpieza y sanitización de zona de trabajo 2. Lavado de equipo de trabajo	Guantes de plástico Escobillones de cerda dura Detergente grado analítico Etanol 96 °	1 cada 72 h	Operador 2	
	Acondicionamiento de los biorreactores	1. Limpieza y sanitización de zona de trabajo 2. Lavado de equipo de trabajo	Guantes de plástico Microfibra Detergente grado analítico Etanol 96 °	1 por lote		
	Esterilización de los biorreactores	1. Limpieza y sanitización del área y equipo de trabajo 2. Lavado y sanitización de equipo de procesamiento 3. Lavado de utensilios y equipo de procesamiento	Guantes de plástico Microfibra Etanol 96 °	1 por lote		
3. Fermentación	Toma de muestra de la fermentación	1. Limpieza y sanitización de zona de trabajo 2. Lavado de equipo de trabajo	Microfibra Etanol 96 °	1 por hora	Operador 3	
	Caracterización de los productos de fermentación	1. Limpieza y sanitización de zona de trabajo 2. Lavado de equipo de trabajo	Guantes de plástico Escobillones de cerda suave Detergente grado analítico Etanol 96 ° Agua destilada	1 por lote		
4. Cosecha	Centrifugación	1. Limpieza y sanitización de utensilios 2. Lavado y sanitización de equipo de procesamiento 3. Lavado de utensilios y equipo de procesamiento	Guantes de plástico Escobillones de cerda dura Detergente grado alimenticio Sanitizante grado alimenticio	1 por lote	Operador 4	

Figura 26: Lista de verificación de limpieza para el proceso de producción de probióticos por CCLA en biorreactor de 7 L.

1.5.1.4. **SEIKETSU (ESTANDARIZAR) Y SHITSUKI (DISCIPLINA)**

Cada una de las actividades de las etapas del proceso de producción de probióticos en CCLA en biorreactor de 7 L, con excepción de la fermentación, se llevaron a cabo por quintuplicado para poder medir y definir los mejores tiempos repetibles por actividad.

Formato de observaciones de tiempo								Fecha: 05/diciembre/2018	
								Observador: J. Carlos Peña Partida	
Observación del proceso:		PRODUCCIÓN DE PROBIÓTICOS POR CCLA EN BIORREACTOR DE 7L						Equipo #: 1	Análisis #: 1 - #5
# de actividad	Componente de la actividad	1	2	3	4	5	Mejor tiempo repetible (h)	Observaciones	
1	Recepción de materias primas	0.12	0.18	0.15	0.20	0.13	0.13		
		0.12	109.90	193.98	278.57	362.53			
2	Inspección de materias primas	0.18	0.22	0.15	0.20	0.22	0.22		
		0.30	110.12	194.13	278.77	362.75			
3	Acondicionamiento de materias primas	1.53	1.70	1.75	1.57	1.72	1.71		
		1.83	111.82	195.88	280.33	364.47			
4	Elaboración del medio MBT	4.17	4.27	4.38	4.28	4.22	4.28	Incluye la elaboración de melazas y del extracto de té verde, junto con el proceso de mezclado	
		6.00	116.08	200.27	284.62	368.68			
5	Caracterización del medio MBT	0.88	0.95	0.98	0.88	0.92	0.88		
		6.88	117.03	201.25	285.50	369.60			
6	Precultivos y acondicionamiento de MO's	73.17	72.77	72.92	73.08	73.12	73.1	Incluye en paralelo el acondicionamiento de los biorreactores, su carga con medio de cultivo MBT, su esterilización y la inoculación previa a la fermentación	
		80.05	189.80	274.17	358.58	442.72			
7	Acondicionamiento de reactores	1.55	1.58	1.70	1.40	1.55			
		81.60	191.38	275.87	359.98	444.27			
8	Esterilización de reactores	1.87	1.88	1.87	1.90	1.88			
		83.47	193.27	277.73	361.88	446.15			
9	Inoculación de reactores	0.38							
		83.85							
10	Fermentación	24.33					24.33	Incluye en paralelo la caracterización de productos de fermentación	
		108.18							
11	Caracterización de los productos de fermentación	0.98							
		109.17							
12	Cosecha de biomasa	0.55	0.57	0.63	0.52	0.57	0.57		
		109.72	193.83	278.37	362.40	446.72			
Tiempo por ciclo:		109.72	84.12	84.53	84.03	84.32	105.22		

Figura 27: Formato de observaciones de tiempo (en h) para el proceso de producción de probióticos por CCLA en biorreactor de 7L

Como se aprecia en la figura 27, los tiempos reportados son similares a los expuestos en el diagrama de flujo del proceso, con la diferencia que en este formato cada una de las actividades fue desglosada y medida por separado, lo que permitió calcular el tiempo de ciclo por cada repetición. Es importante resaltar, sin embargo, que a partir de la segunda repetición no se pudo llevar a cabo la fermentación ni las actividades relacionadas con esta etapa del proceso por lote alimentado por lo que en el formato se “aprecia” un aparente descenso del tiempo de ciclo para cada repetición subsecuente. Se incluyó el tiempo de ciclo completo para la primera repetición a manera de estándar para comparar el resto; si se elimina el tiempo de fermentación de la primera corrida, así como los de sus etapas auxiliares, se obtiene un tiempo de ciclo de 84.02 h, similar al resto de las repeticiones. Al realizar una prueba de normalidad, se aprecian que los tiempos de ciclo se comportan como normales (A.D. = 0.353), con una media de proceso (sin contar el tiempo de fermentación) de 84.204 ± 0.218 h.

Tras analizar los tiempos que llevaba cada una de las actividades del proceso de producción de probióticos por CCLA en biorreactor de 7 L, se optimizó el flujo de trabajo reduciendo los tiempos y movimientos desarrollados por cada uno de los operadores responsables de las actividades. Esto se muestra en una hoja de trabajo estandarizado donde, por medio de un diagrama de espagueti (ver figura 28), se muestra el mejor flujo de operación destacando las actividades que pueden ser efectuadas en paralelo y que, en consecuencia, se traducen en una optimización de tiempos y mayor eficiencia por parte de los operadores. Se aprecian en el diagrama los doce subprocesos de las cuatro actividades y el flujo de trabajo de cada operador distinto se muestra de un color diferente; así mismo, se indican aquellas actividades que se consideran como puntos de inspección del proceso. Adicionalmente, se hizo un análisis de brechas al comparar el flujo de trabajo contra el *Takt-time* y el *pitch* del proceso. Se calculó una brecha de 10.86 h con respecto al *Takt-time*, mientras que sólo de 0.57 h con respecto al *pitch* del proceso. Esto representa una desviación de 86.39 % con respecto al *Takt-time* y de 4.54 % con respecto al *pitch*. De esta manera se corrobora que la mejor manera de analizar el proceso es por medio de *pitch* ya que toma en cuenta la capacidad de producción.

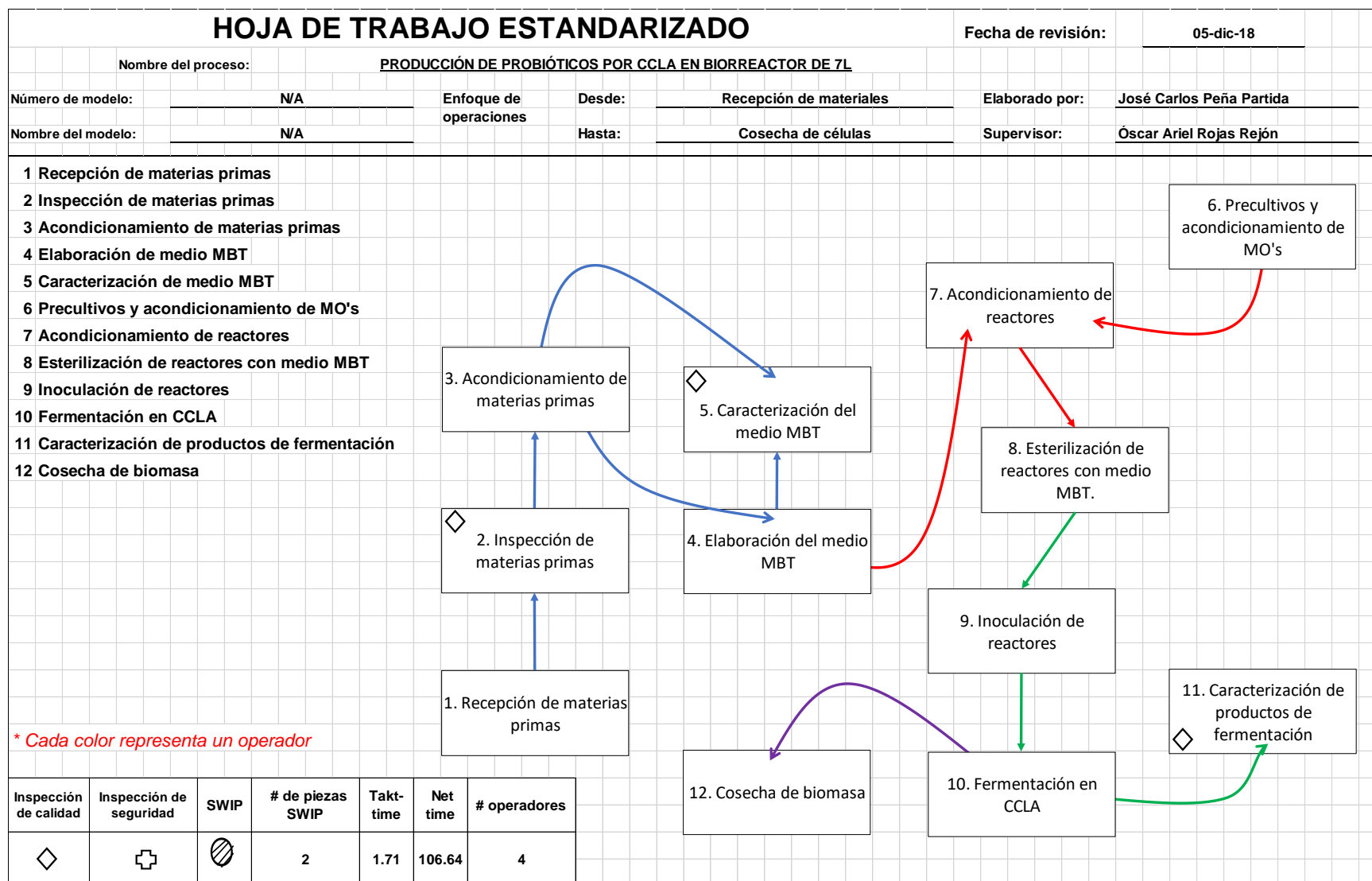


Figura 28: Hoja de trabajo estandarizado donde se muestra la optimización de tiempos y movimientos para el proceso de producción de probióticos por CCLA para biorreactor de 7L por medio de un diagrama de espagueti del proceso. Cada color de flecha de flujo representa un operador distinto.

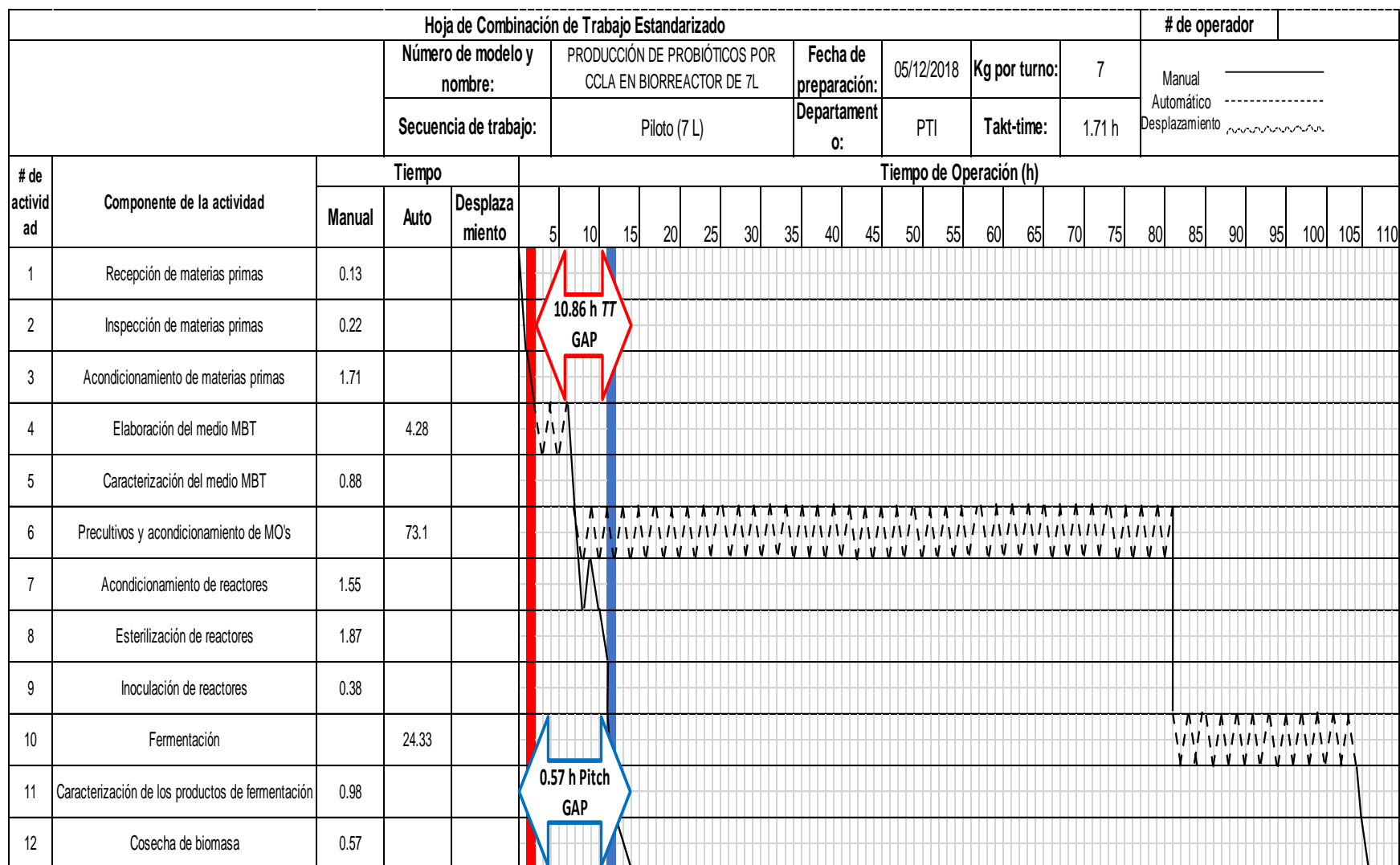


Figura 29: Hoja de combinación de trabajo estandarizado donde se muestra un análisis de brechas entre el tiempo de proceso (12.57 h), el pitch (12 h) y el Takt-time (1.71 h) para el proceso de producción de probióticos por CCLA en biorreactor de 7 L

1.6. BALANCE

1.6.1. BALANCE DE LAS CARGAS DE TRABAJO

Una vez definidas las brechas del proceso, se procedió a efectuar un análisis del tiempo de las actividades que cada uno de los operadores del proceso de producción de probióticos por CCLA en biorreactor de 7 L llevó a cabo. Como observamos en la hoja combinada de trabajo estandarizado (figura 29), se aprecia una gran brecha entre el proceso y el *Takt-time* de operación; esto puede traducirse en una mala distribución de las cargas de trabajo por falta de actividades de parte de los operadores del proceso. Con base en el análisis de brechas se identificó una diferencia de horas de trabajo de 84.67, 58.33, 63.92 y 68.08 % por los operadores # 1, 2, 3 y 4, respectivamente, con respecto al *pitch* del proceso. Con base en esta información se calculó el número óptimo de operadores que eran necesarios para la ejecución del proceso de producción de probióticos, que resultó de sólo 2 operadores, lo que significa una reducción de 50 % de personal. De acuerdo con el nuevo número de operadores, se redistribuyó la carga de trabajo como se aprecia en la figura 30 de la siguiente manera:

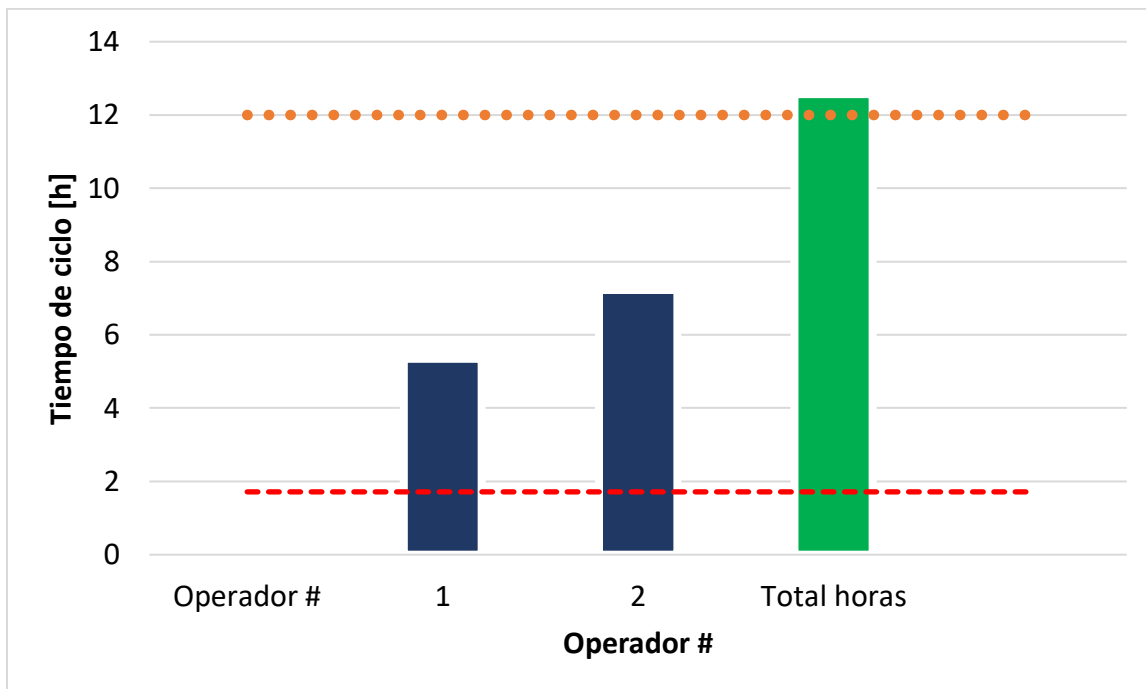


Figura 30: Tiempo de ciclo por actividad/operador y totales de horas efectivas para el proceso de producción de probióticos por CCLA en biorreactor de 7 L una vez redistribuida la carga de trabajo. Se muestra el Takt-time (■) de 1.72 h, así como el pitch. (□) de 12 h.

- Operador 1: Encargado de todas las actividades relacionadas con la preparación del medio MBT (recepción e inspección de materias primas, su acondicionamiento, la elaboración del medio MBT, incluido el extracto de té verde y su caracterización fisicoquímica). Se encargará, además, del monitoreo de los preinóculos durante sus 72 h de fermentación.
- Operador 2: Encargado de todas las actividades relacionadas con el bioproceso (acondicionamiento y esterilización de biorreactores, su inóculo, caracterización de los productos de fermentación y la cosecha de células). Se encargará, además, del monitoreo del proceso fermentativo durante sus 24 h de fermentación.

Se observa que, con las mejoras propuestas, se disminuye la brecha entre los operadores #1 y #2, contra el *pitch* del proceso hasta 55.41 y 39.83 %, es decir, una disminución de brechas del 47.62 % con respecto a la distribución de cargas de trabajo original.

1.6.2. RESULTADOS DE LA IMPLEMENTACIÓN DE LAS 5'S

Finalmente, una vez implementadas las mejoras de 5's para el proceso de producción de probióticos por CCLA en biorreactor de 7 L se volvió a desarrollar el diagnóstico de la auditoría de 5's. Los resultados se muestran en cuadro 3 en el cual se aprecia que todas las categorías tuvieron una mejoría de, al menos, un nivel de tal manera que al hacer la suma del puntaje total del cuestionario se obtiene una calificación de 12, equivalente a 52 % de implementación de la estrategia, es decir, una mejora de 24 % con respecto al estado original; sigue habiendo oportunidad de mejora principalmente en las categorías de selección y orden, principalmente, las cuales pueden ser atacadas durante el escalamiento del proceso a nivel industrial.

Cuadro 3: Diagnóstico final después de la implementación de la estrategia para la reducción de desperdicios y estandarización por auditoría de 5's para el proceso de producción de probióticos

CATEGORÍA	PUNTAJE	DIAGNÓSTICO
1. <i>Seiri</i> (Seleccionar)	3	Existe un área separada para los objetos innecesarios, así como un registro de éstos. No existen más de 4 violaciones de selección en el área de trabajo.
2. <i>Seiton</i> (Ordenar)	2	Es obvio dónde los objetos necesarios pertenecen por medio del uso de etiquetas o señalética. No existen más de 6 violaciones de orden en el área de trabajo.
3. <i>Seiso</i> (Limpieza)	4	La limpieza se utiliza como una herramienta de inspección para el mantenimiento preventivo. Los problemas de limpieza se identifican y se toman acciones preventivas al respecto. No existen más de 2 violaciones de limpieza en el área de trabajo.
4. <i>Seiketsu</i> (Estandarizar)	2	Los estándares de 5's se documentan y publican de manera visual y los puntajes para las primeras tres categorías son superiores a 2, en cada una. No existen más de 6 violaciones de estandarización en el área de trabajo.
5. <i>Shitsuki</i> (Disciplina)	1	50 % de los operadores en el área de trabajo (en todos los turnos) han sido entrenados en 5's. Cada una de las primeras cuatro categorías cuentan con puntajes superiores a 2. No existen más de 6 violaciones de disciplina en el área de trabajo.

2. IMPLEMENTACIÓN DE LA METODOLOGÍA DMAIC DE SIX SIGMA

2.1. DEFINICIÓN DEL PROBLEMA

2.1.1. *Project Charter*

En la figura 31 se muestra el *Project Charter* del proyecto; la descripción, objetivos y alcance se establecieron con base en los mismos que se encuentran en las secciones xx de este documento. El impacto financiero que se busca atacar se estableció con base en la reducción de costos por kg de formulación a partir del costo del medio comercial MRS.

PROJECT CHARTER					
Nombre del proyecto: Producción de probióticos por CCLA a escala piloto (7 L)			Fecha de revisión:		05/12/2018
Reto del negocio			Objetivos del proyecto		
Optimizar y estandarizar el proceso de producción de biomasa probiótica de tres microorganismos, <i>Lactobacillus plantarum</i> , <i>Lactobacillus rhamnosus</i> y <i>Saccharomyces boulardii</i> , en un medio económicamente viable (MBT) a base de melazas de betabel, azúcar y extracto de té verde, a nivel piloto con el fin de obtener rendimientos celulares similares a los obtenidos por medios comerciales pero con una reducción de costos de, al menos, 50 % por el uso de medios comerciales.			1. Reducir el impacto financiero del proceso de producción de probióticos por el medio de cultivo a, cuando menos, el 50 % del costo del medio comercial, utilizando un medio optimizado (MBT) a partir de los resultados de un RSM-DOE. 2. Lograr rendimientos celulares ($Y_{x/s}$) de, cuando menos, 1×10^9 UFC mL ⁻¹ (los mismos que se obtienen con medios comerciales) utilizando un medio optimizado (MBT) a nivel piloto (7 L).		
Alcance			Impacto Financiero		
Proceso a nivel laboratorio (0.25 L) y su posterior escalamiento a nivel piloto (7 L); posteriormente, poder replicar las condiciones en un proceso industrial de no menos de 100 L por lote.			Reducir el costo de uso de materias primas por el medio de cultivo para la producción de probióticos en CCLA de \$4242.00 MXN kg ⁻¹ en, al menos, 50 %.		
Métricas			Equipo		
Impacto financiero, FPY, concentración celular, entradas X al proceso (temperatura, oxígeno disuelto, agitación, concentración de sustrato, tiempo de proceso, pH).			Nombre		Rol
Plan de proyecto			Peña Partida	José Carlos	Líder del proyecto
Proceso	Fecha de conclusión	Fase del objetivo	Rojas Rejón	Óscar Ariel	Director del proyecto
D: Documetación del problema	05/12/2018	<div><div></div></div> 100.00%			
M: Medición y estandarización del proceso	05/12/2018	<div><div></div></div> 100.00%			
A: Estandarización de las técnicas	05/12/2018	<div><div></div></div> 100.00%			
I: Optimización e implementación de mejoras	05/12/2018	<div><div></div></div> 100.00%			
C: Documentación de la situación de mejora	05/12/2018	<div><div></div></div> 100.00%			
Firmas y fechas					
Campeón:	Black Belt:		Líder:		Finanzas:
			José Carlos Peña Partida		

Figura 31: Project charter del proceso de producción de probióticos por CCLA a escala piloto 7 L

Los precios se calcularon con base en los costos reportados directamente por el proveedor (SIGMA-ALDRICH, 2018), al mes de noviembre, a un tipo de cambio de 20.41 MXN/USD. Así mismo, se incluyen las métricas a analizar durante las etapas de medición e implementación y un plan de entrega de las distintas etapas del proyecto, con base en los objetivos planteados a inicios de éste.

2.1.2. A3 del proceso

Para el desarrollo del A3 del proceso se integraron herramientas previamente descritas en la etapa de definición de la necesidad del cliente con otras nuevas, las cuales se describen a continuación, que permitieron definir el problema de central del proceso de producción de probióticos en CCLA en biorreactor de 7 L. El formato completo se puede consultar en el anexo de este documento.

2.1.2.1. Descripción del problema

Comercialmente, el costo de materiales para el crecimiento de este probióticos se suele desarrollar utilizando medios comerciales, principalmente el medio MRS. Existen diversos proveedores en el mercado, sin embargo, el costo promedio por kilogramo de producto asciende a \$4,242.00 MXN. Adicional a esto, los rendimientos de producción de biomasa ($Y_{X/S}$) relacionados con el uso de este medio de cultivo suelen ser bajos (inferiores a 45 %), por lo que en el estado ideal del proceso que se propone en este trabajo se busca sea tener rendimientos ($Y_{X/S}$) similares o superiores a 45 % con costos de materiales inferiores en, al menos, 50 % con respecto a los costos del medio comercial; adicionalmente, se pretende conferir valor agregado al producto al producir un compuesto simbiótico con polifenoles de té verde y antoxantinas de betabel como prebióticos. Con base en esto, se desarrolló un análisis FODA del proceso, el cual se muestra en la figura 32. En la matriz se pudieron identificar:

- Como fortalezas del proceso: su diseño pues no se han encontrado fuentes publicadas que lleven a cabo producción de probióticos de maneras similares; el medio de cultivo, ya que es una opción económica elaborado en su mayoría con ingredientes locales y que puede

conferir valor agregado al producto terminado por efecto prebiótico; y la especialización y preparación del equipo de desarrollo del proceso.

- Como debilidades del proceso: no se cuenta con financiamiento alguno a la fecha, debido a que este proyecto se deriva de un proyecto de investigación nacido y financiado por ITESO; además, debido al riguroso control que se espera del proceso, se requiere una alta tecnificación lo cual implica una inversión inicial alta para poder llevar a cabo la producción requerida para satisfacer la demanda del cliente.
- Como oportunidades del proceso: existe realmente poca competencia nacional, con menos de 10 marcas competidoras en el mercado, lo que representa una oportunidad interesante para su colocación, además, en México, la regulación del producto es prácticamente nula, lo cual implica una inversión de tiempo menor para poder cumplir con los requerimientos gubernamentales al respecto; por otro lado, la tasa de crecimiento del mercado de probióticos a nivel nacional e internacional han reportado valores cercanos al 10 % con tendencias a aumentar, debido a la preocupación creciente de la población por cuestiones de salud y bienestar.

	POSITIVOS	NEGATIVOS
INTERNOS	Fortalezas Diseño de un proceso innovador que no existe en el mercado. Optimización del medio de cultivo a partir de diseños experimentales con pruebas en laboratorio. Proceso completamente diseñado por un equipo especializado en el tema.	Debilidades No hay financiamiento del proyecto ya que se trata de un proyecto académico interno de ITESO. Inversión inicial alta debido a la tecnificación del proceso y la capacitación de los operadores.
EXTERNOS	Oportunidades Poca competencia nacional, así como prácticamente nula regulación al respecto de la comercialización del producto. Tasas de crecimiento constantes cercanas al 10 % anual tanto en mercado nacional como internacional.	Amenazas Tipo de cambio fluctuante que impacta sobre costo de materiales. Desconocimiento de la gente acerca del producto lo cual pudiera representar una colocación lenta en el mercado.

Figura 32: Análisis FODA del diseño del proceso de producción de probióticos por CCLA.

- Como amenazas del proceso: parte de los componentes y equipo de producción se venden en dólares. En México, el tipo de cambio es altamente fluctuante, donde algunas fuentes incluso han pronosticado que su valor siga en aumento por depreciación del peso mexicano para los siguientes años (Mera, 2018). Esta depreciación tendrá repercusión directa en el costo de producción y de materiales; por otro lado, sigue habiendo mucha desinformación por parte del consumidor acerca de este tipo de productos, lo que implica tener que destinar recursos para campañas de información para evitar una colocación lenta en el mercado de consumo humano.

2.1.2.2. Definición del problema

Como se describió anteriormente, se definieron siete necesidades por el cliente a partir de un QFD; así mismo, éstas se analizaron con base en los requerimientos técnicos del proceso, concluyendo que el medio de cultivo es el principal contribuyente por atacar, así como otras variables

estrechamente ligadas con el proceso de producción de probióticos, como la viabilidad celular y su concentración. Adicionalmente al análisis realizado en el capítulo mencionado, se desarrolló una matriz SIPOC, la cual se puede consultar en la figura 33, donde se incluyen todos los proveedores necesarios para el proceso de elaboración de probióticos por CCLA con base en la información colectada durante el escalamiento a nivel piloto de 7 L, de la cual se pudieron identificar 10 proveedores; adicionalmente, con base en el VSM, se definieron las entradas y salidas del proceso, quince y cinco, respectivamente. Finalmente, los clientes (internos y externos) con los que se tendría responsabilidad hasta la etapa de cosecha celular descrita en el diagrama de flujo de proceso resultaron tres. Esta matriz se pretende sirva como referencia para facilitar la identificación de las relaciones entre proveedores – proceso – clientes del proceso al momento de su escalamiento a nivel industrial.

S	I	P	O	C
Mercado de abastos	Betabeles	1. Recepción de materias primas	Complejo prebiótico	COFEPRIS
Costco	Azúcar	2. Inspección de materias primas	Inspección de PT	SSA
Raff Lactingredientes	Extracto de levadura	3. Acondicionamiento de materias primas	Análisis de PT	Encapsulamiento
ITESO	Té verde	4. Elaboración del medio MBT	FPY	
Difco	LP, LR y SB	5. Caracterización del medio MBT	Orden de producción	
Sigma	Biorreactores	6. Precultivos y acondicionamiento de MO's		
Meyer	Bombas	7. Acondicionamiento de reactores		
Applikon	Tuberías	8. Esterilización de reactores con medio MBT		
Masterflex	Sensores (pH, O ₂ , biomasa)	9. Inoculación de reactores		
Torrey	Reactivos de laboratorio	10. Fermentación en CCLA		
	Balanzas	11. Caracterización de productos de fermentación		
	Orden de producción	12. Cosecha de biomasa		
	Operadores			
	Inspectores			
	Normatividad			

Figura 33: Matriz SIPOC del proceso de producción de probióticos por CCLA en biorreactor de 7 L; S: proveedores; I: entradas; P: proceso; O: salidas; C: clientes.

2.1.2.3. Metas

Esta sección se basó en las mismas metas establecidas en el *Project Charter* del proceso, el cual se puede consultar en el anexo de este documento.

2.1.2.4. Análisis de la causa – raíz

Adicional al diagrama de causa – raíz desarrollado durante la definición de las necesidades del cliente durante la implementación de *Lean* se generó un diagrama de necesidades críticas del cliente (CTQ), el cual se puede consultar en la figura 34. En este diagrama se incluyeron los 7 requerimientos del cliente definidos a partir del QFD, identificando como necesidades primordiales el impacto en la salud del consumidor, el costo del producto y la vida útil de éste. Al relacionar estos requerimientos con los requerimientos técnicos del proceso, se pudieron definir los requerimientos críticos de control (CCR's) y sus niveles mínimos para poder satisfacer las necesidades de calidad críticas (CTQ's) descritas por los clientes.

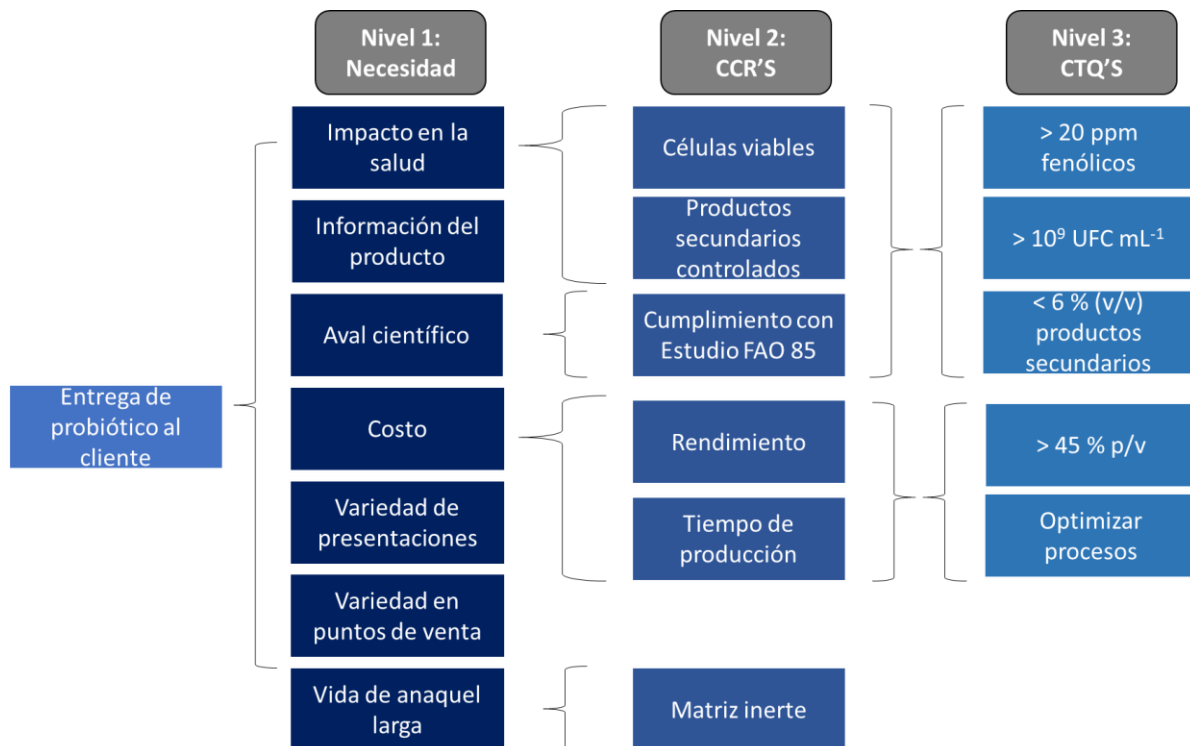


Figura 34: Diagrama CTQ de los requerimientos del cliente; CCR's: requerimientos críticos de control; CTQ's: requerimientos críticos para la calidad

2.1.2.5. Herramientas para medición y análisis

Como se describió anteriormente, en esta sección se mencionan las herramientas estadísticas, de calidad y de control que se establecieron para llevar a cabo el análisis y medición del proceso, entre las que destacan las especificaciones de operación, diseño de experimentos, gráficos de control, capacidad del proceso, análisis de regresión no lineales, y técnicas estandarizadas de laboratorio, entre otras.

2.1.2.6. Tiempos y actividades

Esta sección se basó en las mismas actividades, y sus tiempos de entrega, establecidos en el *Project Charter* del proceso, el cual se puede consultar en el anexo de este documento.

PLAN DE COLECCIÓN DE DATOS PARA EL PROCESO DE PRODUCCIÓN DE PROBIÓTICOS POR CCLA									
Medición	Tipo de dato	Operacional		Medición			Muestreo		
		Qué	Cómo	X	Y	Verificación	Qué	Dónde	Cuánto
Sólidos disueltos	Continuo	Inspección visual	Brixómetro manual	° brix		R&R	En inspección	Caracterización del medio MBT	100%
Densidad	Continuo	Inspección visual	Picnómetro	g mL ⁻¹		R&R	En inspección	Caracterización del medio MBT	Por lote
Peso	Continuo	Gravimetría	Balanza analítica	g		Calibración + R&R	En proceso	Equipo de medición semiautomático	Por lote
Viscosidad	Continuo	Inspección visual	Viscosímetro	cP		Calibración + R&R	En inspección	Equipo de medición semiautomático	Por lote
Temperatura	Continuo	Inspección visual	Termopar	° C		Calibración + R&R	En proceso	Equipo de medición automático	100%
pH	Continuo	Inspección visual	Electrodo automático de pH	N/A		Calibración + R&R	En proceso	Equipo de medición automático	100%
O ₂ disuelto	Continuo	Inspección visual	Electrodo automático de O ₂	% (v/v)		Calibración + R&R	En proceso	Equipo de medición automático	100%
Agitación	Continuo	Inspección visual	Protocolo de proceso	RPM		Control del proceso	En proceso	Equipo de medición automático	100%
Flujo	Continuo	Reología	Protocolo de proceso	L h ⁻¹		R&R	En inspección	Equipo de medición manual	Por lote
Biomasa	Continuo	Gravimetría	Peso seco		g L ⁻¹	Curva de calibración	En inspección	Equipo de medición semiautomático	100%
	Continuo	Microbiológicas	Crecimiento en placa		UFC mL ⁻¹	Curva de calibración	En inspección	Equipo de medición manual	100%
Substrato - glucosa	Continuo	Colorimetría	Carbohidratos reductores	g L ⁻¹		Curva de calibración	En inspección	Equipo de medición semiautomático	100%
Substrato - sacarosa	Continuo	Colorimetría	Carbohidratos totales	g L ⁻¹		Curva de calibración	En inspección	Equipo de medición semiautomático	100%
Ácido láctico	Continuo	Colorimetría	Método de Borshchevskaya		g L ⁻¹	Curva de calibración	En inspección	Equipo de medición semiautomático	100%
Contenido fenólico	Continuo	Colorimetría	Método de Folin		ppm	Curva de calibración	En inspección	Equipo de medición semiautomático	100%

Figura 35: Plan de colección de datos para el proceso de producción de probióticos por CCLA

2.2.MEDICIÓN

2.2.1. Plan de colección de datos X|Y

En la figura 35 se muestra el plan de colección de datos del proyecto, el cual considera todas las variables dependientes (y) del proceso: biomasa y productos de fermentación (contenido fenólico, ácido láctico) y las variables independientes (x): sólidos disueltos, densidad, peso, viscosidad, temperatura, pH, oxígeno disuelto, agitación, flujo y substrato (tanto glucosa como sacarosa). Una vez establecidas las variables de análisis, se menciona el método o técnica por medio de la cual se han de cuantificar, los cuales vienen detallados, así como sus unidades de medición, la validación de la medición y el tipo de medición (automática, semiautomática o manual) y la frecuencia de medición de acuerdo con las necesidades del proceso descrito en el diagrama de flujo del proceso.

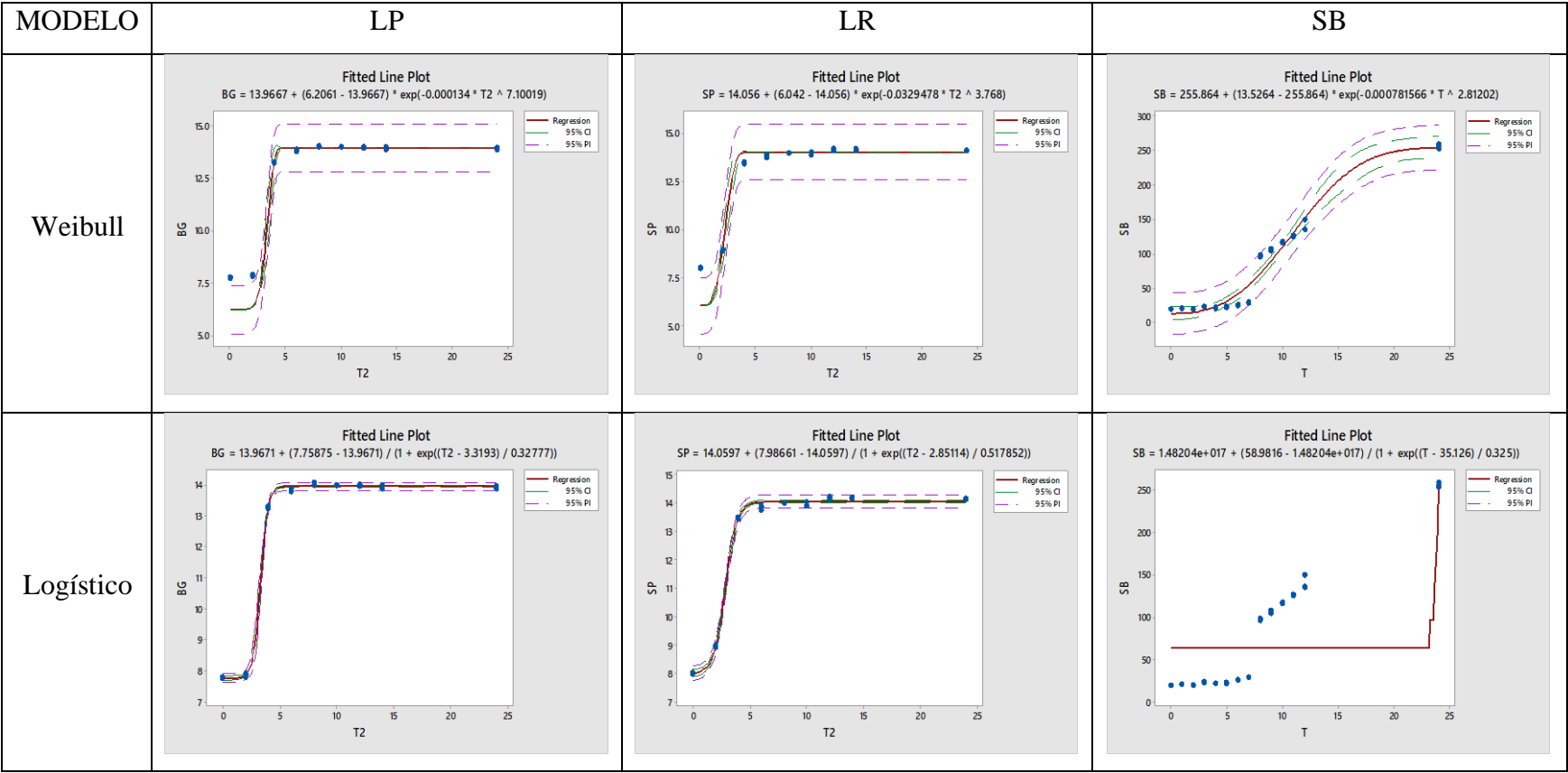
Los resultados de la primera validación, efectuada durante el escalamiento del proceso a nivel piloto de 7 L (curvas de calibración) para las variables biomasa, flujo, contenido fenólico y substrato (tanto glucosa como sacarosa) se pueden consultar en el anexo de este documento.

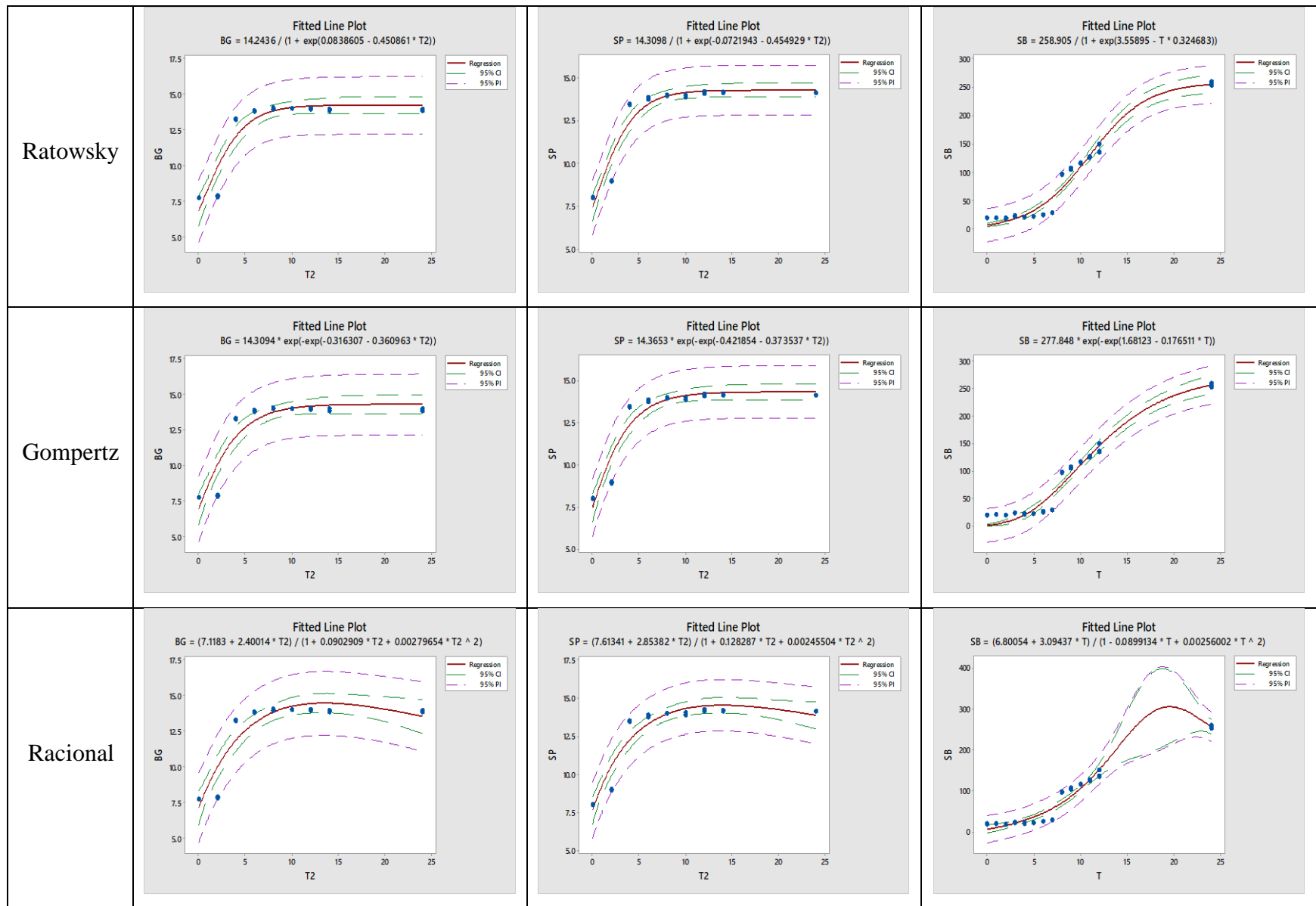
2.3.ANÁLISIS

2.3.1. Caracterización de los parámetros cinéticos de crecimiento de los tres microorganismos en medios comerciales

El comportamiento general del proceso fermentativo se modeló para cada microorganismo, como se muestra en el cuadro 4, para los tres microorganismos LP, LR y SB, respectivamente. En los tres casos, se aprecia el comportamiento esperado de generación de biomasa, consumo de substrato y, en el caso de LP y LR, generación de producto, es decir, una tendencia exponencial con pendiente positiva para la generación de biomasa y producto y una tendencia exponencial con pendiente negativa para el consumo de biomasa (Schepers, Thibault, & Lacroix, 2002; Aguirre-Ezkauriatza, Aguilar-Yáñez, Ramírez-Medrano, & Álvarez, 2010). Para poder definir los parámetros de cinéticos de crecimiento de los tres microorganismos, se inició con el análisis de la generación de biomasa. Para ello, los valores experimentales de crecimiento de los tres microorganismos fueron graficados en función del tiempo de fermentación, utilizando CurveExpert Professional® 2.6 como se aprecia en el cuadro 4 para los tres microorganismos, correspondientes a LP, LR y SB, respectivamente.

Cuadro 4. Comportamiento cinético del crecimiento de biomasa para LP, LR y SB en función del tiempo en MRS y YPD en cultivo por lote, ajustados a los modelos no lineales de Weibull, Logístico, Ratowsky, Gompertz y Racional.





En el mismo software, los datos experimentales fueron sujetos a un análisis de regresión no lineal para encontrar el modelo matemático que mejor explicara su comportamiento, obteniendo como resultado para los tres casos que los modelos de Weibull (ecuación 21), el modelo logístico (ecuación 22), el de Gompertz (ecuación 23), el de Ratowsky (ecuación 24) y el modelo racional (ecuación 25) fueron los que mejor describieron el crecimiento celular de LR, LP y SB. De todos ellos, se encontró que el mejor ajuste fue el modelo de Weibull, con base en su estadígrafo de bondad de ajuste. Este modelo, publicado originalmente por Waloddi Weibull en 1939, ha sido ampliamente utilizado en teoría de confiabilidad para describir análisis de mantenimientos, sin embargo (y debido a su gran flexibilidad) también ha sido utilizado para describir una gran variedad de fenómenos físicos como identificación de fallas tempranas en procesos y productos, predicción de tiempos de garantías, planeación con base en modelos logísticos y como un modelo de alerta temprana ante posibles desgastes de componentes, entre otros (Warrington, 2008); este modelo, también conocido como el modelo de “curva de bañera” (ver ecuación 3) se ha utilizado en el ámbito biológico para describir la relación entre las tasas de crecimiento y muerte de una población, particularmente en biomedicina para analizar las esperanza de vida humana y su mortandad; además, este modelo cuenta con amplia aplicación en el ámbito ecológico, principalmente, para modelar la generación de biomasa fotosintética y fenómenos de deforestación (Fleming, 2001).

$$y = \theta_1 - \theta_2 e^{-\theta_3 x^{\theta_4}} \quad \dots \text{Ecuación 21}$$

$$y = \theta_1 * (1 + \theta_2 e^{-\theta_3 x})^{-1} \quad \dots \text{Ecuación 22}$$

$$y = \theta_1 * (1 + e^{-\theta_2 - \theta_3 x})^{-1} \quad \dots \text{Ecuación 23}$$

$$y = \theta_1 * e^{-e^{\theta_2 - x * \theta_3}} \quad \dots \text{Ecuación 24}$$

$$y = \frac{\theta_1 + x * \theta_2}{1 + x * \theta_2 + x^2 * \theta_3} \quad \dots \text{Ecuación 25}$$

Adicionalmente, algunos autores han reportado la gran robustez que confiere el uso de este modelo para la descripción del crecimiento de biomasa microbiana sobre otro tipo de modelos no lineales (López, Prieto, Dijkstra, Dhanoa & France, 2004; Nyholm, Sörensen, & Kusk, 1992). Los demás modelos, principalmente los modelos de Gompertz y el logístico, han sido también probados para

explicar el comportamiento del crecimiento de distintos microorganismos (Mitchell, Von Meien, Krieger, & Dalsenter, 2004), (Dalgaard & Koutsoumanis, 2001), (Nyholm, Sørensen, & Kusk, 1992).

Una vez efectuado este análisis, se procedió a capturar los datos experimentales en Minitab® 18 para encontrar las constantes cinéticas de los modelos. Para calcular la velocidad específica de crecimiento, se realizó un análisis de regresión no lineal para cada uno de los modelos, utilizando como variable de predicción al tiempo y al crecimiento celular como variable de respuesta. Se utilizó un nivel de significancia de 0.05 para llevar a cabo los supuestos de regresión para cada uno de los modelos, así como el algoritmo de Levenberg-Marquardt para desarrollar las iteraciones hasta convergencia. Para calcular la constante de afinidad, se hizo una segunda regresión no lineal utilizando como variable de predicción al sustrato residual y a las velocidades específicas de crecimiento como variable de respuesta utilizando, igualmente, un nivel de significancia de 0.05 para llevar a cabo los supuestos de regresión para cada modelo y el algoritmo de Levenberg-Marquardt para desarrollar las iteraciones hasta convergencia. El resumen de los resultados de la regresión que describe el modelo cinético de crecimiento se muestra en el cuadro 5.

Cuadro 5: Indicadores de los modelos de regresión no lineal de SB, LR y LP en medios MRS y YPD en cultivo por lote; $\alpha = 0.05$.

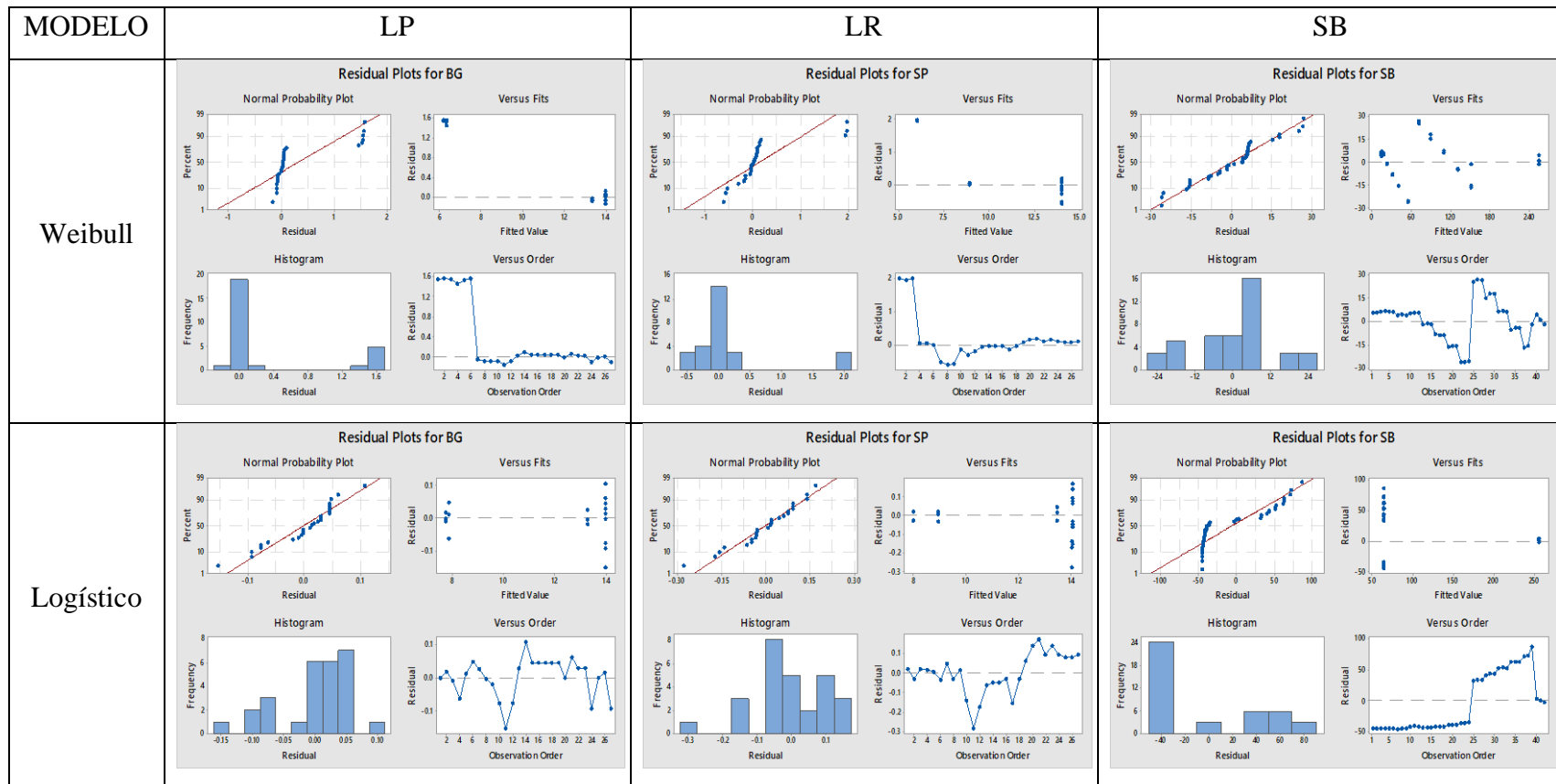
M.O.	Modelo	R²	P	Θ_1	Θ_2	Θ_3	Θ_4
	Weibull	0.9994	0.002	13.9667	6.2061	0.0001	7.0017
	Logístico	0.8789	< 0.000	14.2436	1.0874	0.4509	–
LP	Ratowsky	0.8789	< 0.000	14.2437	0.0839	0.4509	–
	Gompertz	0.8641	< 0.000	14.3094	-0.3163	0.3609	–
	Racional	0.8573	< 0.000	7.1182	2.4003	0.0903	0.0028

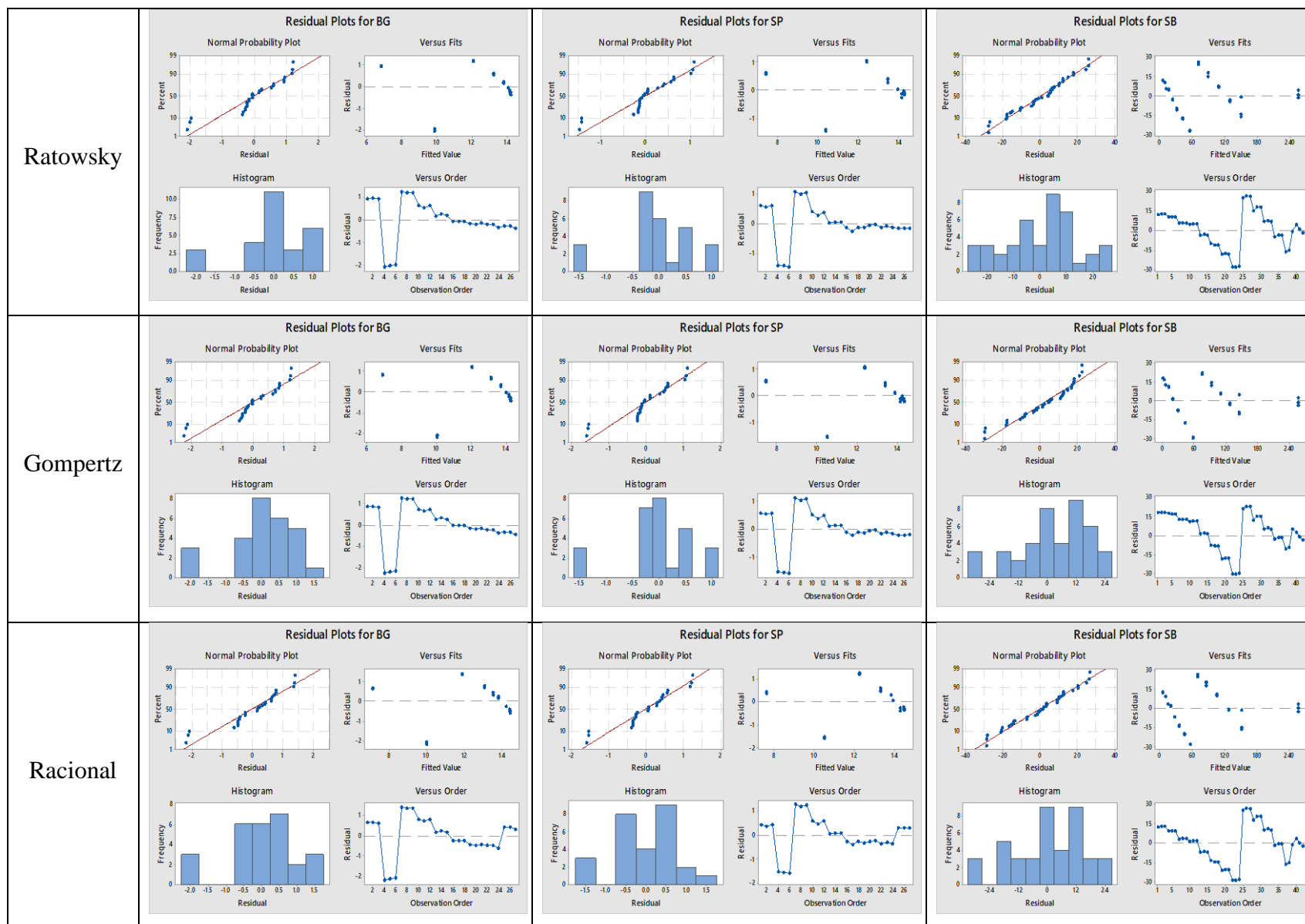
	Weibull	0.9979	< 0.000	14.0558	6.0423	0.0126	3.7684
	Logístico	0.9598	< 0.000	14.3098	0.9304	0.4549	–
LR	Ratowsky	0.9598	< 0.000	14.3098	-0.0722	0.4549	–
	Gompertz	0.9110	< 0.000	14.3653	-0.4219	0.3735	–
	Racional	0.9005	< 0.000	7.6134	2.8539	0.1283	0.0024
	Weibull	0.9643	< 0.000	255.6900	240.7710	0.0006	2.8674
	Logístico	0.9589	< 0.000	258.9051	35.1263	0.3247	–
SB	Ratowsky	0.9589	< 0.000	258.9053	3.5589	0.3247	–
	Gompertz	0.9545	< 0.000	277.8506	1.6812	0.1765	–
	Racional	0.9522	< 0.000	6.8011	3.0941	-0.0899	0.0026

Como se aprecia en el cuadro, el análisis de regresión generó coeficientes de determinación R^2 ajustados de superiores a 0.85 para LP, LR y SB en todos los modelos evaluados, mientras que los P-values de la prueba de bondad de ajuste fueron, prácticamente, de 0.00 para todas las condiciones de evaluación, lo que indica que la prueba de bondad de ajuste es aceptada, con el nivel de confianza establecido del 95 %, es decir, las regresiones no lineales – con los cinco modelos evaluados – sí resultaron ser significativas para los tres microorganismos.

Al analizar los residuales de las distribuciones de Weibull, para los tres microorganismos, se aprecia que las tres distribuciones sí se comportan como una distribución normal de datos, no se viola el principio de homocedasticidad y presentan aleatoriedad. Es interesante resaltar que el comportamiento cíclico que se aprecia en el orden de observaciones es esperado al tratarse de gráficos de cinéticas microbianas de crecimiento.

Cuadro 6. Análisis de residuales de los modelos de regresión no lineal de Weibull, Logístico, Ratowsky, Gompertz y Racional para LP, LR y SB, respectivamente.





Para determinar las constantes cinéticas de los modelos, se procedió a efectuar una transformación lineal para encontrar los coeficientes de regresión β_0 y β_1 , con su respectivo análisis de regresión lineal utilizando Minitab® 18; como variable de predicción se utilizó el tiempo y al crecimiento celular como variable de respuesta. Se utilizó un nivel de significancia de 0.05 para llevar a cabo los supuestos de regresión para cada uno de los modelos. El resumen de los resultados de la regresión se muestra en el cuadro 7 y los gráficos resultantes de los modelos linealizados se pueden apreciar en la figura 36.

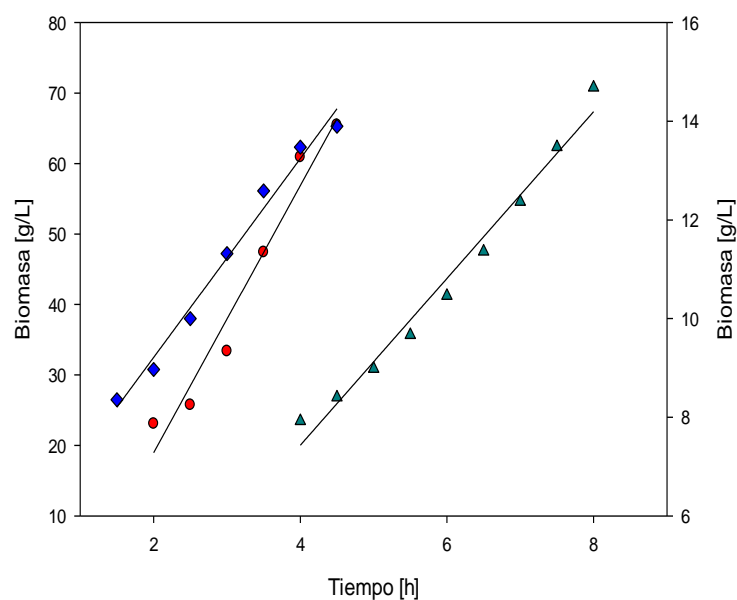


Figura 36: Modelos de Weibull linealizados del crecimiento celular de LP (●), LR (◆) y SB (■) en medio MRS y YDP en cultivo por lote.

Cuadro 7: Ecuaciones de los modelos linealizados para LP, LR y SB en medios comerciales (MRS y YPD); $\alpha = 0.05$.

Modelo	Ecuación lineal
Weibull	$\ln \left(\ln \left(\frac{a}{b-y} \right) \right) = c \ln(d) + c \ln(x)$
Logístico	$\ln(a-y) - \ln(y) = -cx + \ln(b)$
Ratowsky	$\ln(a-y) - \ln(y) = -cx + b$
Gompertz	$\ln \left(\ln \left(\frac{a}{y} \right) \right) = -cx + b$
Racional	$\ln(\ln(y))^{-1} = \frac{1 + cx + dx^2}{a + bx}$

Donde “y” corresponde al crecimiento microbiano (g L^{-1}) y “x”, al tiempo de fermentación (h).

En el análisis de regresión de los modelos, se apreció que los residuales no violaban el principio de homocedasticidad y se encontraban normalmente distribuidos. El análisis de varianza arrojó valores de F de 2780.5, 11016.8 y 207.005 para LR, LP y SB, respectivamente ($\alpha = 0.05$), donde los coeficientes de regresión β_0 y β_1 , para todos los modelos, resultaron significativos al analizarlos por medio de pruebas t ($\alpha = 0.05$). Los modelos obtenidos fueron capaces de explicar 99.76, 99.94 y 96.43 % de la variación de los datos cinéticos, respectivamente, con base en sus coeficientes de determinación R^2 ajustados.

Una vez analizados y evaluados los modelos linealizados, se procedió al cálculo de las variables cinéticas $\mu_{\text{máx}}$, la constante de afinidad por el sustrato K_s , los rendimientos globales de biomasa en función del sustrato, $Y_{X/S}$ y los rendimientos globales producto en función del sustrato, $Y_{P/S}$. Las constantes para los tres microorganismos se muestran en el cuadro 8. Se compararon los resultados obtenidos contra algunos reportados en trabajos previos.

Cuadro 8: Comparación de los parámetros cinéticos $\mu_{\text{máx}}$, K_S , $Y_{X/S}$ y $Y_{P/S}$ para LP, LR y SB en medios comerciales (MRS y YPD) y otros reportados en la literatura; $\alpha = 0.05$.

Constante cinética	Modelo matemático	LP		LR		SB	
		Este trabajo	Otros trabajos	Este trabajo	Otros trabajos	Este trabajo	Otros trabajos
$\mu_{\text{máx}}$ [h ⁻¹]	Weibull	0.427		0.434		0.545	
	Logístico	0.154		0.601		0.227	
	Ratowsky	0.154	0.382 ^[1]	0.601	0.460 ^[2]	0.227	0.648 ^[3]
	Gompertz	0.133		0.521		0.136	
	Racional	0.759		0.535		0.332	
	Monod	0.229		0.266		0.001	
K_S [g _{glucosa} L ⁻¹]	Weibull	0.228		0.188		4.951	
	Logístico	0.201	1.320 ^[4]	78.769	0.300 ^[5]	0.663	2.000 ^[6]
	Ratowsky	1.604		4.367		0.411	

	Gompertz	1.715		3.468		12.858	
	Racional	0.951		0.972		0.686	
	Monod	7.569		2.609		0.163	
<hr/>							
$Y_{X/S}$ [g g ⁻¹]		0.335	0.450 ^[1]	0.391	1.000 ^[5]	2.000 ⁺	0.230 ^[6]
<hr/>							
$Y_{P/S}$ [g g ⁻¹]		0.117	0.970 ^[1]	0.009	1.000 ^[5]	*N/D	

*N/D: No disponible.

+Como la suma del rendimiento de glucosa y sacarosa.

1. Fu, W., & Mathews, A.P., “Lactic acid production from lactose by *Lactobacillus plantarum*: kinetic model and effects of pH, substrate, and oxygen”, *Biochemical Engineering Journal*, Vol. 3, p., 163 – 170, 1999.
2. Pham, P. L., Dupont, I., Roy, D., Lapointe, G., & Cerning, J., “Production of Exopolysaccharide by *Lactobacillus rhamnosus* R and Analysis of Its Enzymatic Degradation during Prolonged Fermentation”, *Applied And Environmental Microbiology*, Vol. 66, No. 3, p. 2302 – 2310, 2000.
3. El Enshasy, H. A., & Elsayed, E. A., “Kinetics of Cell Growth and Invertase Production by the Biotherapeutic Yeast, *Saccharomyces boulardii*”, *Journal of Scientific & Industrial Research*, Vol. 76, p. 477 – 484, 2017.
4. Sharma, V., & Mishra, H. N., “Unstructured kinetic modeling of growth and lactic acid production by *Lactobacillus plantarum* NCDC 414 during fermentation of vegetable juices”, *LWT - Food Science and Technology*, Vol. 59, p. 1123 – 1128, 2014.
5. Kwon, S., Yoo, I. K., Lee, W. G., Chang, H. N., & Chang, Y., K., “High-rate Continuous Production of Lactic Acid by *Lactobacillus rhamnosus* in a Two-stage Membrane Cell-recycle Bioreactor”, *Biotechnology and bioengineering*, Vol. 73, No. 1, p. 25 – 34, 2001.
6. Trigueros, D. E. G., Fiorese, M. L., Kroumov, A. D., Hinterholtz, C. L., Nadai, B. L., & Assuncao, G.M., “Medium optimization and kinetics modeling for the fermentation of hydrolyzed cheese whey permeate as a substrate for *Saccharomyces cerevisiae* var. *boulardii*”, *Biochemical Engineering Journal*, Vol. 110, p. 71 – 83, 2016.

Se aprecia que las velocidades específicas de crecimiento ($\mu_{\text{máx}}$) calculadas en este trabajo, comparadas contra trabajos previos, resultaron en valores muy similares; haciendo un análisis de varianza de una vía ($\alpha = 0.05$) se encontró que no existen diferencias significativas entre ellas. Caso contrario fueron las constantes de afinidad por el substrato (K_s); en el caso de las bacterias, los valores obtenidos fueron 83 % inferior para LP y 37 % inferior para LR, comparados contra valores reportados en la literatura. Esto es un indicador que la fuente de carbono (glucosa) del medio, en las condiciones de operación, no fue la más adecuada para el crecimiento de los microorganismos. Esto puede tener varias implicaciones: que se vea limitado el crecimiento celular por substrato o que el metabolismo celular puede desviarse de la producción de biomasa a productos del crecimiento, concretamente en este caso, ácido láctico. En el caso de la levadura, el comportamiento fue contrario: se obtuvo 2.4 veces una mejor afinidad a la mezcla de substratos (glucosa y sacarosa) que con otros trabajos previos. Los rendimientos de biomasa/substrato para LP fueron similares a los reportados por trabajos previos: haciendo un análisis de varianza de una vía ($\alpha = 0.05$) se encontró que no existen diferencias significativas entre ellas. En cambio, para LR

y SB no fue el caso, sin embargo, es de notar que tanto para las dos bacterias utilizadas en este trabajo, los rendimientos de crecimiento fueron similares entre ellos. Se aprecia que sólo se tuvo 33 y 39 % de aprovechamiento de sustrato destinado para el crecimiento celular. Comparando los valores de rendimiento producto/sustrato, nuevamente, se aprecia que existen grandes diferencias comparadas contra otros trabajos. Este comportamiento es congruente con otros reportados en la literatura (Aguirre-Ezkauriatza, Aguilar-Yáñez, Ramírez-Medrano, & Álvarez, 2010) pues es bien sabido que este tipo de microorganismos prefieren desviar su ruta metabólica para la producción de ácido láctico sustrato que funge como el último aceptor de electrones en el metabolismo de crecimiento del microorganismo (Karki, 2017). En el caso de la levadura, se apreció que las condiciones de cultivo sí favorecieron su sobreproducción de biomasa: se tuvo un 100 % de aprovechamiento de cada sustrato (glucosa y sacarosa) destinado completamente a la generación celular. Además, no se observó la presencia de ácido láctico en la fermentación.

Finalmente, se hizo una prueba de hipótesis para analizar si hubo diferencias entre el crecimiento de los tres microorganismos en el cultivo por lote (ver figura 37).

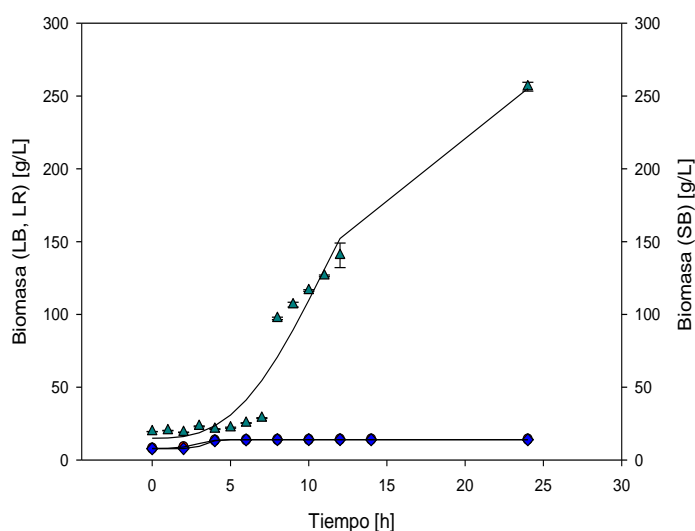


Figura 37: Crecimiento celular de LP (●), LR (◆) [eje Y2] y SB (■) [eje Y1] en medio MRS y YPD en cultivo por lote.

Utilizando Minitab® 18; los datos cinéticos fueron tratados por medio de una prueba ANOVA de una vía, utilizando al crecimiento celular de los tres microorganismos como variable de respuesta.

Se utilizó un nivel de significancia de 0.05 para llevar a cabo las pruebas de hipótesis, las cuales se muestran a continuación:

H_0 : No existen diferencias significativas entre las medias del crecimiento de los tres M.O.s

H_1 : Existen diferencias significativas entre las medias del crecimiento de los tres M.O.s

El resumen de los resultados de la prueba ANOVA se muestra en el cuadro 9 y los gráficos de las comparaciones probadas se pueden apreciar en las figuras 38 y 39.

Cuadro #9: Indicadores de la prueba ANOVA para comparar el crecimiento (g L⁻¹) de SB, LP y LR en medios MRS y YPD en cultivo por lote; $\alpha = 0.05$.

F	P	μ_{SB}	μ_{LR}	μ_{LP}
20.47	< 0.000	73.100	12.754	12.523

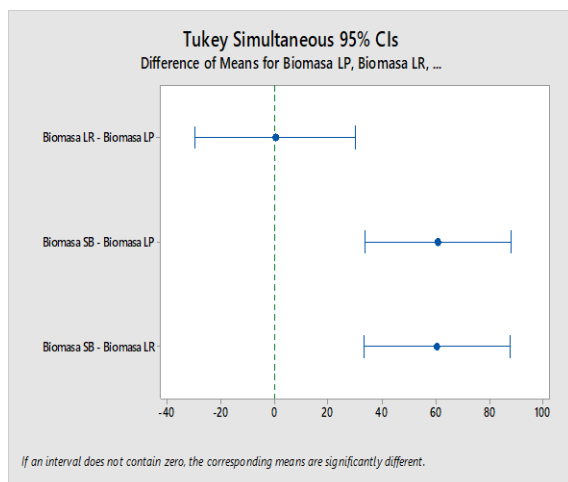


Figura 39: Pruebas de Tukey comparando el crecimiento (g L⁻¹) de SB, LR y LP en medios MRS y YPD en cultivo por lote

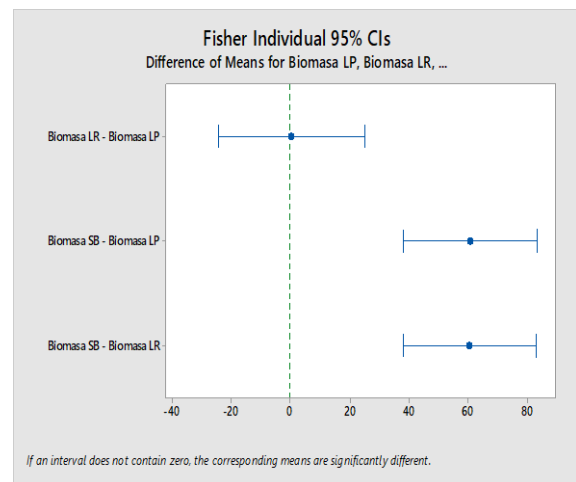


Figura 38: Pruebas de Fischer, comparando el crecimiento (g L⁻¹) de SB, LR y LP en medios MRS y YPD en cultivo por lote

En la prueba de hipótesis, se obtuvo un valor de F de 20.47 ($\alpha = 0.05$), con un P-value de 0, lo que vuelve significativa a la prueba. Se desarrollaron dos pruebas de comparación: Tukey y Fischer: con valores individuales de nivel de confianza de 98.08 %, se aprecia claramente que entre las medias del crecimiento de las bacterias LP y LR, no hay diferencias significativas entre ellas. En

cambio, al comparar con la levadura, se aprecia que existen claras diferencias entre las medias de las muestras, lo que permite comprobar, con 95 % de confianza, que el crecimiento de SB fue completamente distinto de LP y LR.

2.3.2. Caracterización de los parámetros cinéticos de crecimiento de los tres microorganismos en medios MBT por lotes

De igual manera que se hizo para los medios comerciales, el comportamiento general del proceso fermentativo en medio MBT se modeló para cada microorganismo, como se muestra en el cuadro 10 correspondientes a LP, LR y SB, respectivamente; a diferencia del análisis inicial, la biomasa fue medida como UFC mL⁻¹, para realizar la transformación a concentración celular después del modelado matemático; los valores experimentales de crecimiento de los tres microorganismos fueron graficados en función del tiempo de fermentación, utilizando CurveExpert Professional® 2.6 como se aprecia en el cuadro 10, correspondientes a LP, LR y SB. Tras el análisis de regresión no lineal, se encontró que los tres mejores modelos para explicar su comportamiento fueron el modelo de Richards (ecuación 26), el cual es una derivación del modelo de Gompertz, el modelo logístico (ecuación 27) y el modelo racional (ecuación 28), siendo el mejor de todos el de Richards, con base en su estadígrafo de bondad de ajuste. Las ecuaciones que describen cada modelo se muestran a continuación:

$$y = \theta_1 * (1 + e^{\theta_2 - \theta_3 x})^{1/d-1} \quad \dots \text{Ecuación 26}$$

$$y = \theta_1 * (1 + \theta_2 e^{-\theta_3 x})^{-1} \quad \dots \text{Ecuación 27}$$

$$y = \frac{\theta_1 + x * \theta_2}{1 + x * \theta_2 + x^2 * \theta_3} \quad \dots \text{Ecuación 28}$$

Cuadro 10: Indicadores de los modelos de regresión no lineal de SB, LR y LP en medios MRS y YPD en cultivo por lote; $\alpha = 0.05$.

M.O.	Modelo	R ²	P	Θ_1	Θ_2	Θ_3	Θ_4
LP	Weibull	0.9999	0.001	5.2474	3.7576	0.0000	5.8548
	Logístico	0.9919	< 0.000	-0.0001	-1.00	0.0000	—
	Ratowsky	0.9715	< 0.000	2480.50	7.8996	0.0703	—
	Gompertz	0.9363	< 0.000	58439.00	2.4067	0.0070	—
	Racional	0.9998	< 0.000	1.5203	0.0019	0.0163	-0.0019
LR	Weibull	0.9959	< 0.000	63.8566	62.6824	0.0000	4.0765
	Logístico	0.9976	< 0.000	-0.1079	-1.1047	0.0039	—
	Ratowsky	0.9885	< 0.000	3555.98	9.2932	0.1698	—
	Gompertz	0.9861	< 0.000	169490.0	2.6062	0.0016	—
	Racional	0.9995	< 0.000	1.5194	-0.0029	-0.0085	-0.0013
SB	Weibull	0.9973	< 0.000	194.80	194.47	0.0000	3.7964
	Logístico	0.9997	< 0.000	-1.6867	-2.4671	0.0036	—
	Ratowsky	0.9991	< 0.000	1574.23	8.9021	0.2374	—
	Gompertz	0.9988	< 0.000	89146.00	2.6338	0.0270	—
	Racional	0.9999	< 0.000	1.3066	-0.1309	-0.1369	0.0039

Como se aprecia en el cuadro, el análisis de regresión generó coeficientes de determinación R² ajustados de superiores a 0.999 para todas las pruebas, mientras que los P-values de la prueba de

bondad de ajuste fueron, prácticamente, de 0.00 para todas las condiciones de evaluación, lo que indica que la prueba de bondad de ajuste es aceptada, con el nivel de confianza establecido del 95 %, es decir, las regresiones no lineales – con los tres modelos evaluados – sí resultaron ser significativas para los tres microorganismos.

Al realizar la comparación de los resultados de crecimiento en cultivo con el medio MBT con los resultados de crecimiento en medios comerciales (MRS, YPD), se encontraron comportamientos cinéticos similares, es decir, se encontró que, tras 12 h de proceso, se había alcanzado la etapa estacionaria de crecimiento. Las cinéticas de consumo de sustrato (carbohidratos) se muestran en la figura 40. Se aprecia un consumo exponencial de carbohidratos y, transcurridas las 12 h de proceso, se aprecia un cambio en la pendiente, indicador de haber alcanzado la etapa de crecimiento máxima. A las 24 h de fermentación, el consumo había sido total.

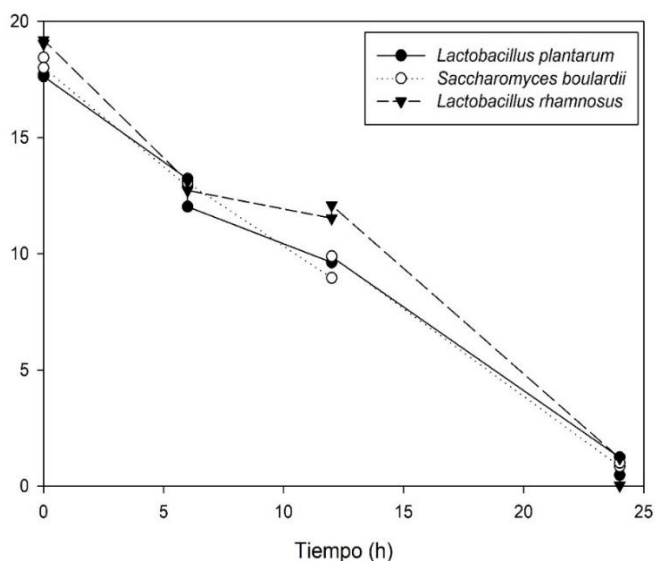
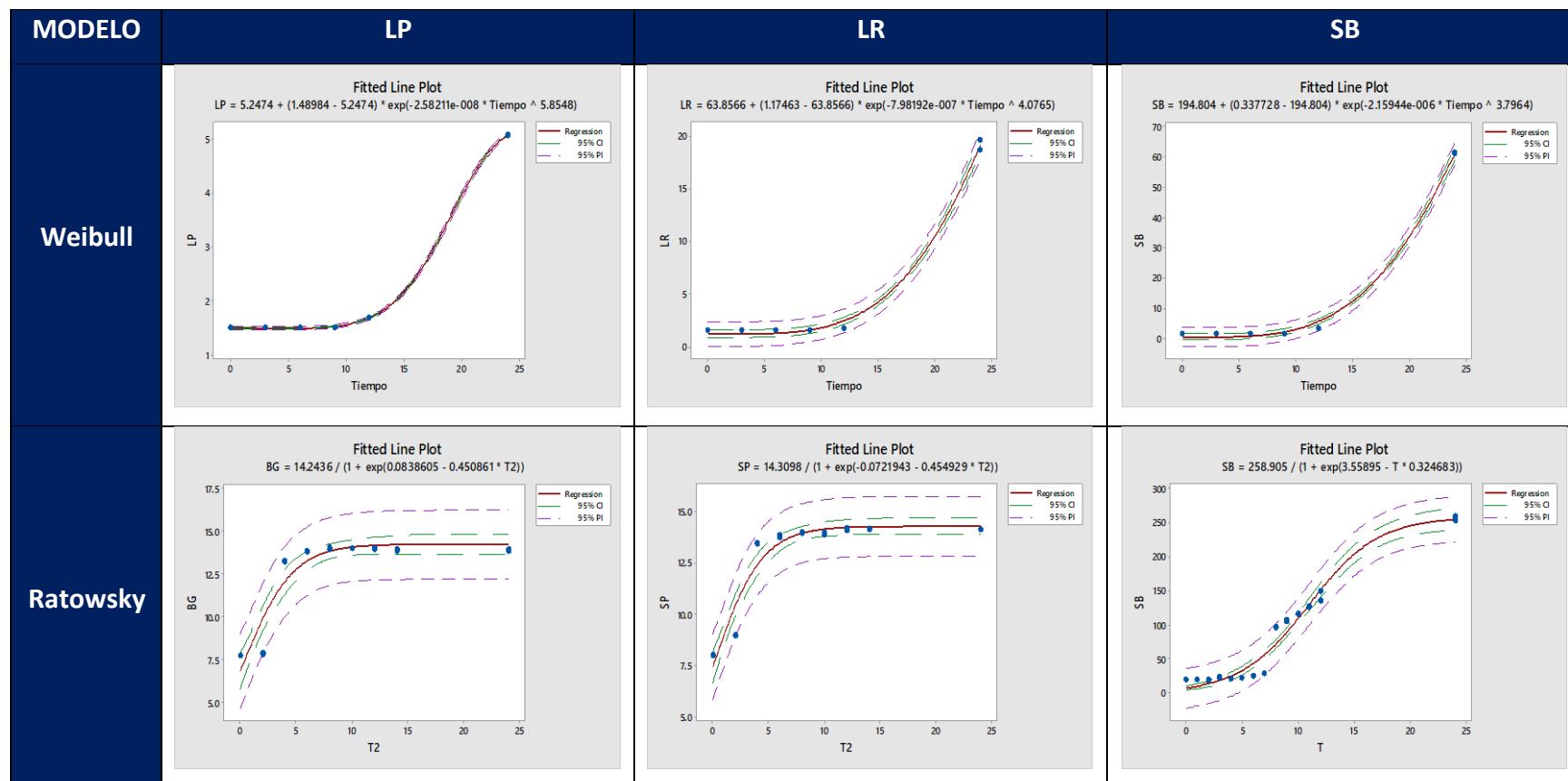


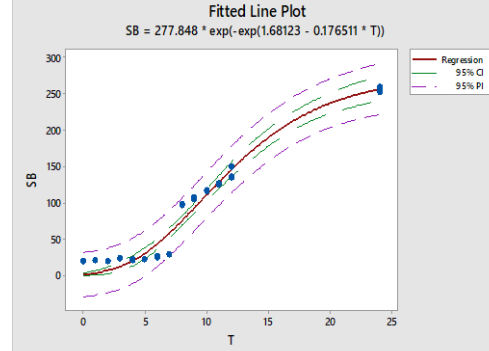
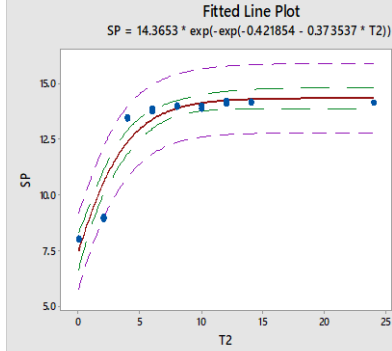
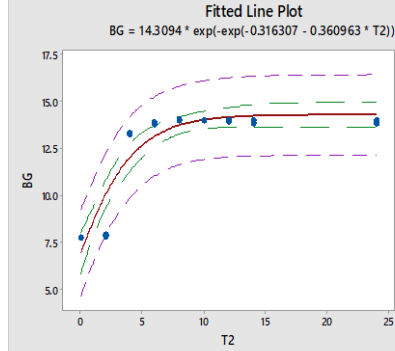
Figura 40: Consumo de sustrato (medido como glucosa) de LP, LR y SB en medio MBT.

Adicionalmente, se evaluó la cinética de compuestos fenólicos totales remanentes en el medio MBT. Como se aprecia en la figura 41, hubo un consumo de 10 ppm, en promedio, de compuestos fenólicos totales.

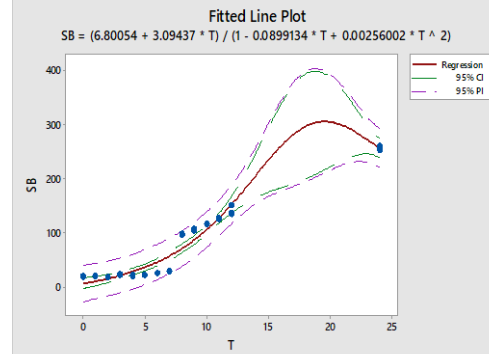
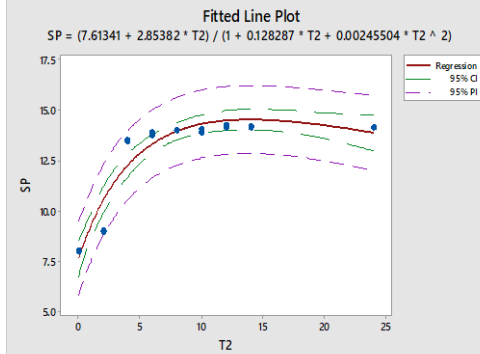
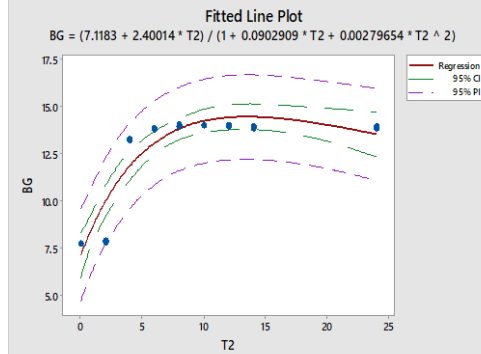
Cuadro 4. Comportamiento cinético del crecimiento de biomasa para LP, LR y SB en función del tiempo en MRS y YPD en cultivo por lote, ajustados a los modelos no lineales de Weibull, Logístico, Ratowsky, Gompertz y Racional.



Gompertz



Racional



El comportamiento de los fenólicos fue constante, después de 5 h de proceso, teniendo una concentración remanente de, aproximadamente, 30 ppm de fenólicos a las 24 h de fermentación, lo cual es un indicador positivo que el producto puede ser denominado simbiótico.

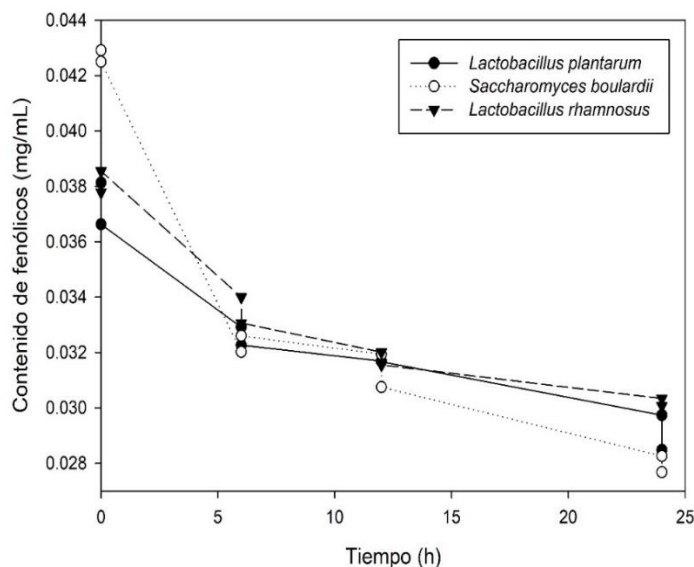


Figura 41 : Consumo de compuestos fenólicos totales de LP, LR y SB en medio MBT.

Finalmente, se comparó el contenido de biomasa contra el obtenido en los medios comerciales. Los resultados se muestran en el cuadro 11. Como se puede observar, los resultados obtenidos para tanto las bacterias como las levaduras fueron similares; LP creció menos de 1 logaritmo con respecto al medio comercial, mientras que SB, 1 más con respecto al medio comercial. Esto significa que, de combinarse los tres microorganismos en el reactor de mantenimiento, las cargas microbianas serían iguales que con los medios comerciales ($>10^8$ UFC mL⁻¹) lo cual es un indicador que el medio MBT es una buena alternativa al medio comercial.

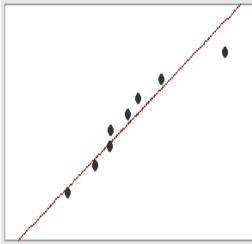
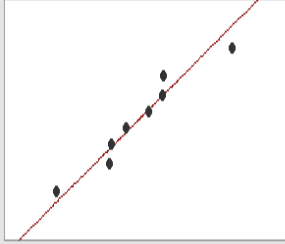
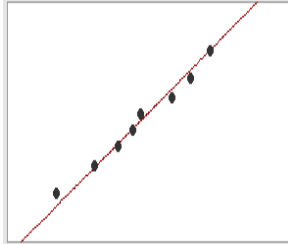
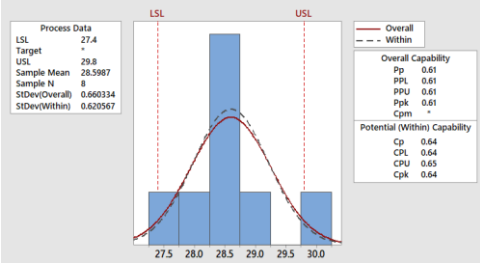
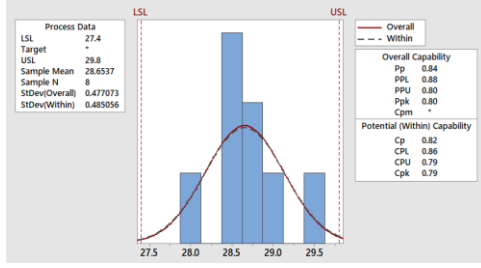
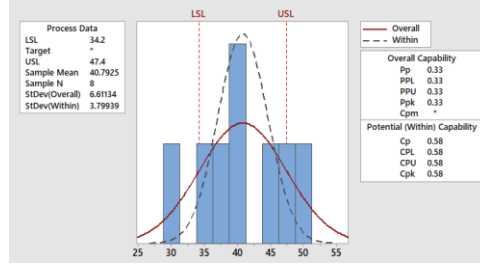
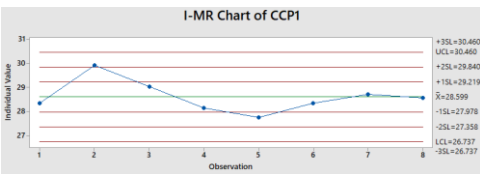
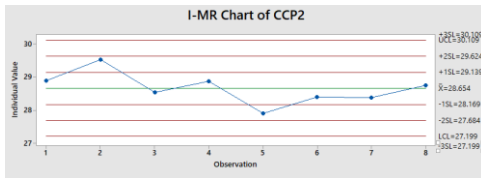
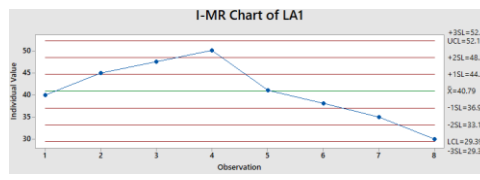
Cuadro #11: Comparación del crecimiento microbiano (UFC mL⁻¹) de LP, LR y SB (tras 24 h de fermentación) en los diferentes medios probados en este trabajo.

Medio	LP	LR	SB
MRS	10 ⁸	10 ⁸	*N/D
YPD	*N/D	*N/D	10 ⁹
MBT	10 ⁷	10 ⁸	10 ¹⁰

2.3.3. Evaluación del comportamiento del bioproceso en cultivo continuo y lote alimentado en medio MBT

Una vez alcanzado el estado estacionario de crecimiento, se compararon los procesos en cultivo continuo (por duplicado) y en lote alimentado (una sola repetición) para evaluar su comportamiento. Utilizando Minitab® 18, se efectuó un análisis de varianza (ANOVA) para evaluar las diferencias entre los procesos así como un análisis de capacidad para explicar su comportamiento, obteniendo los resultados siguientes:

Cuadro 12: Análisis del proceso de producción de probióticos por cultivos continuos (CCP1, CCP2) y lote alimentado (LA1)

PRUEBA	Cultivo continuo #1	Cultivo continuo #1	Lote alimentado #1												
Normalidad	<div><div>Normality Plot The points should be close to the line.</div><div></div><div><div>Normality Test (Anderson-Darling)</div><div><table><tr><td>Results</td><td>Pass</td></tr><tr><td>P-value</td><td>0.464</td></tr></table></div></div></div>	Results	Pass	P-value	0.464	<div><div>Normality Plot The points should be close to the line.</div><div></div><div><div>Normality Test (Anderson-Darling)</div><div><table><tr><td>Results</td><td>Pass</td></tr><tr><td>P-value</td><td>0.626</td></tr></table></div></div></div>	Results	Pass	P-value	0.626	<div><div>Normality Plot The points should be close to the line.</div><div></div><div><div>Normality Test (Anderson-Darling)</div><div><table><tr><td>Results</td><td>Pass</td></tr><tr><td>P-value</td><td>0.964</td></tr></table></div></div></div>	Results	Pass	P-value	0.964
Results	Pass														
P-value	0.464														
Results	Pass														
P-value	0.626														
Results	Pass														
P-value	0.964														
Capacidad del proceso	<div><div>Process Capability Report for CCP1</div><div></div></div>	<div><div>Process Capability Report for CCP2</div><div></div></div>	<div><div>Process Capability Report for LA1</div><div></div></div>												
Gráfico de valores individuales	<div><div>I-MR Chart of CCP1</div><div></div></div>	<div><div>I-MR Chart of CCP2</div><div></div></div>	<div><div>I-MR Chart of LA1</div><div></div></div>												

La prueba ANOVA, con una significancia $\alpha=0.05$, resultó significativa, con un valor $P = 0.000$ ($F = 26.69$) y un coeficiente de determinación R^2 ajustado = 69.07 %. El análisis de medias, por medio de una prueba de Dunnett ($\alpha=0.05$) mostró que existen diferencias entre la corrida efectuada por lote alimentado y las corridas en cultivo continuo, siendo altamente significativa las diferencias, tal como se aprecia en la figura 42. Con base en las medias de cada prueba ($\mu_1=28.599\pm0.66$, $\mu_2=28.654\pm0.477$, $\mu_3=40.793\pm6.61$ g L⁻¹, respectivamente) es posible concluir que el cultivo por lote alimentado fue el más eficiente de los dos cultivos evaluados, en 29.84 %, promedio.

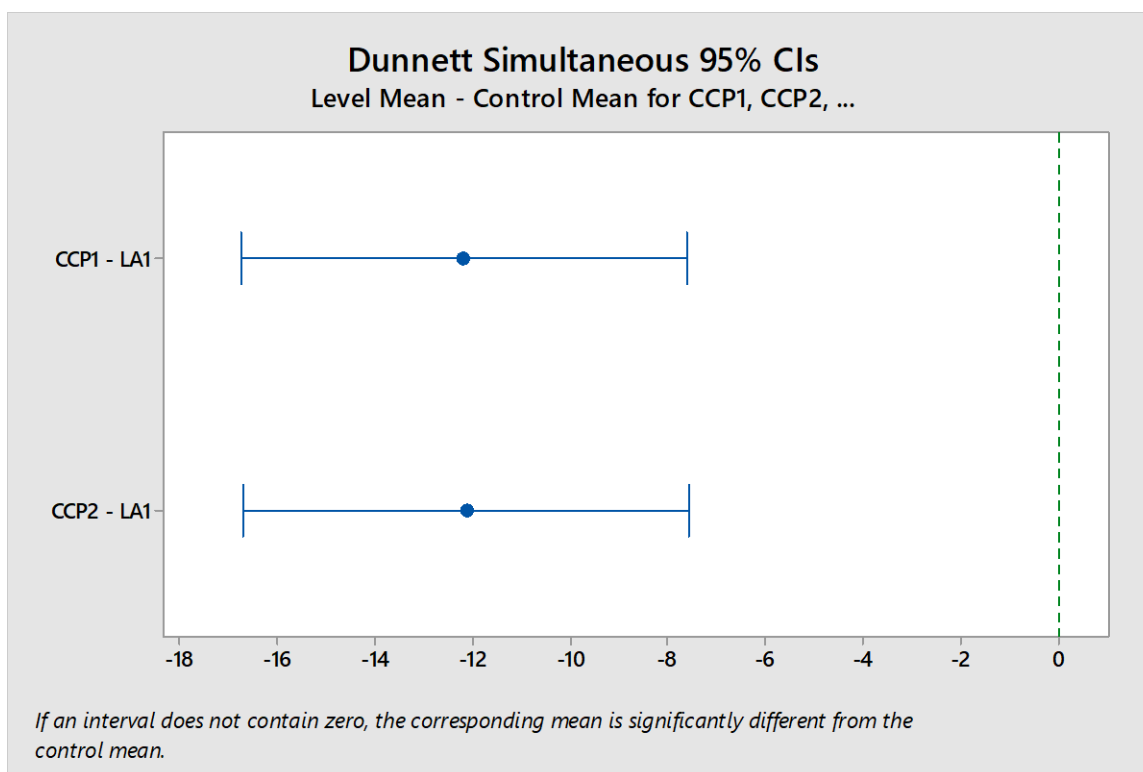


Figura 42: Prueba de Dunnett para comparación de medias entre los cultivos continuos (CCP1, CCP2) y el cultivo por lote alimentado (LA1) para el proceso de producción de probióticos

Posteriormente, se analizó la capacidad de cada uno de los procesos; como se aprecia en el cuadro 12; las tres corridas mostraron un comportamiento normal, con valores de AD de 0.464, 0.626 y 0.964, para el primer y segundo cultivos en continuo y para el lote alimentado, respectivamente. Se establecieron límites de control de ± 2 desviaciones estándar para los cultivos continuos y de ± 1 desviación estándar para el lote alimentado, lo que permitió calcular la capacidad, nivel sigma y defectivos por millón para cada uno de los procesos. Los resultados se muestran en el cuadro 13:

Cuadro #13: Comparación de la capacidad de proceso (C_p , C_{pk}), nivel sigma y defectivos por millón (DPPM) de los procesos en cultivo continuo (CCP1, CCP2) y lote alimentado (LA1) para el proceso de producción de probióticos con medio MBT.

Indicador	CCP1	CCP2	LA1
C_p	0.64	0.82	0.58
C_{pk}	0.64	0.79	0.58
Nivel sigma	2.65	2.00	1.85
DPPM	125,000	26,365	375,000

Se aprecia que los tres procesos evaluados están por debajo del valor recomendado de 1.33 para capacidad de proceso, lo cual es un indicador de que siguen existiendo factores que no están siendo controlados y están contribuyendo a la variación de éste, como pudieran ser los efectos por equipo, técnica de medición, operadores, materiales, ambiente o métodos (Statistical Process Control, 2018); prácticamente, para todos los procesos analizados, se puede concluir que se tiene un nivel sigma de 2, lo cual representa aproximadamente 308,000 DPPMs; así mismo, se muestran los gráficos de valores individuales, en los cuales se puede apreciar que ninguno de los datos muestreados caen más allá de dos desviaciones estándar del proceso, lo cual confirma la capacidad del proceso.

2.3.4. Viabilidad, diseño y optimización del medio de cultivo MBT

Para la formulación del medio optimizado MBT se llevó a cabo una estrategia experimental que constaba de las siguientes etapas:

1. Diseño factorial para definición de las condiciones óptimas de extracción de té verde.
2. Diseño de superficie de respuesta para optimización de la formulación.
3. Diseño factorial para definición de las condiciones óptimas de esterilización del medio MBT.

4. Evaluación del impacto de los metabolitos secundarios sobre la viabilidad de los probióticos en cometabolismo.

2.3.4.1. Diseño factorial 3² para la definición de las condiciones óptimas para la extracción de té verde

Se generó un diseño factorial 3² (DesignExpert®, 11.0 Stat-Ease Minneapolis, MN) para definir las condiciones más adecuadas para maximizar la extracción de los compuestos fenólicos constituyentes del té verde. Los factores de prueba fueron: temperatura de extracción (°C) y concentración de sólidos de té (g 100 mL⁻¹), y como variable de respuesta se midió el contenido de compuestos fenólicos (ppm) por medio del método de Folin-Ciocalteu. La corrida se efectuó por duplicado y el resumen de los resultados del diseño se muestra en el cuadro #14. Todas las combinaciones generadas en el diseño, así como los resultados de la prueba de contenido fenólico se pueden consultar en el anexo de este documento.

Cuadro #14: Características del diseño factorial 3² para definir las condiciones óptimas para la extracción de compuestos afenólicos a partir de sólidos de té verde.

Parámetro	
Tipo de diseño	Factorial 3 ²
Diseño inicial	Factorial completo
Modelo	Lineal
Corridas	18
Bloques	0
Factor A	Temperatura (°C)

Factor B Concentración de té (g 100 mL⁻¹)

Respuesta Contenido fenólico (ppm)

Se analizó el modelo como si fuera lineal, considerando las interacciones de los factores, con un nivel de significancia del 5 %. Como se aprecia en el cuadro 15, el modelo resultó ser significativo ($P < 0.0001$) tras desarrollar la prueba ANOVA ($F = 74.00$), sin falta de ajuste y con un coeficiente de determinación R^2 ajustado de 94.01 %; con base en estos resultados se prosiguió con el análisis. De los factores probados, la concentración de sólidos de té resultó significativa ($P < 0.0001$), así como la interacción entre los dos factores ($P = 0.006$). La ecuación que describe el comportamiento del modelo se presenta como la ecuación 29.

$$C.F. = 0.020 + 1.422 \times 10^{-4}T - 4.524 \times 10^{-3}CT + 1.039 \times 10^{-3}T * CT \quad \text{Ecuación 29}$$

Donde C.F. corresponde al contenido fenólico en ppm, T a la temperatura en °C y CT, concentración de sólidos de té (en g 100 mL⁻¹).

Cuadro #15: Análisis de varianza y resultados del diseño factorial 3² para definir las condiciones óptimas para la extracción de compuestos fenólicos a partir de sólidos de té verde. $\alpha = 0.05$.

Fuente	Suma de cuadrados	G. L.	Cuadrado medio	F	P
Modelo	2.004x10 ⁻⁴	8	2.505 x10 ⁻⁵	74.00	< 0.0001
A: Temperatura	2.141x10 ⁻⁷	2	1.070 x10 ⁻⁷	0.32	0.7367
B: Concentración de té verde (g 100 mL⁻¹)	1.900x10 ⁻⁴	2	9.499 x10 ⁻⁵	280.63	< 0.0001
AB	1.018x10 ⁻⁵	4	2.544 x10 ⁻⁶	7.52	0.0060

Error	3.046x10 ⁻⁶	9	3.385 x10 ⁻⁷	74.00	< 0.0001
Corr. Total	2.034x10 ⁻⁴	17	2.505 x10 ⁻⁵		
R² ajustada	0.9717	R²	0.9850		

A pesar de que el término de temperatura no fue significativo, se decidió mantener el efecto de este factor debido a que su interacción con los sólidos de té si lo fue y con un coeficiente de mayor magnitud; de esta manera se desarrolló una optimización de factores con el fin de maximizar el contenido fenólico, minimizando la temperatura de extracción; el modelo se desarrolló sin ponderación, donde las mejores condiciones de extracción de compuestos fenólicos del té verde se muestran en el cuadro 16:

Cuadro #16: Condiciones optimizadas del diseño factorial 3² para maximizar la extracción de compuestos fenólicos a partir de sólidos de té verde; deseabilidad = 95.0 %.

Fuente	Objetivo	Resultado
Contenido fenólico (ppm)	Maximizar	24.1
A: Temperatura (°C)	Minimizar	70.0
B: Concentración de té verde (g 100 mL⁻¹)	Mantener en rango	4.0

2.3.4.2. Diseño RSM para la optimización de la formulación del medio MBT

Se generó un diseño de superficie de respuesta central compuesto (DesignExpert®, 11.0 Stat-Ease Minneapolis, MN) para optimizar el crecimiento de biomasa probiótica a partir de un nuevo medio de cultivo compuesto por melazas de betabel, extracto de levadura y extracto de té verde (MBT).

Los factores de prueba fueron: pH del medio, fuente de carbono proveniente de melazas de betabel (g L^{-1}) y 40 g L^{-1} de azúcar de caña constantes en todos los experimentos, extracto de levadura (g L^{-1}) y extracto de té verde (mL L^{-1}); como variable de respuesta se midió el crecimiento de biomasa (UFC mL^{-1}) por medio del método de conteo en placa, para correlacionarlo con biomasa total (g L^{-1}). La corrida se efectuó con cuatro réplicas de los puntos factoriales, duplicado para los puntos axiales y 12 puntos centrales; la variación de los niveles fue en función de las α , con un valor de 1.495 y el resumen de los resultados del diseño se muestra en el cuadro #17. Todas las combinaciones generadas en el diseño, así como los resultados de la prueba de crecimiento celular se pueden consultar en el anexo de este documento.

Cuadro #17: Características del RSM para optimizar el crecimiento de biomasa probiótica utilizando medio MBT.

Parámetro	
Tipo de diseño	Superficie de respuesta
Diseño inicial	Central compuesto
Modelo	Cuadrático
Corridas	92
Bloques	0
Factor A	pH
Factor B	Fuente de carbono (g L^{-1})
Factor C	Extracto de levadura (g L^{-1})
Factor D	Extracto de té verde (mL L^{-1})
Respuesta	Biomasa (g L^{-1})

Debido a que la respuesta describe el comportamiento de crecimiento exponencial de los lactobacilos con que fueron inoculados los tubos de reacción, se optó por transformar al modelo de análisis por uno logarítmico natural, el cual se muestra en la ecuación 30:

$$y' = \ln (y + k) \quad \dots \text{Ecuación 30}$$

Donde y' representa la nueva variable de respuesta transformada, “ y ” representa la variable de respuesta (crecimiento de biomasa en g L^{-1}) y k , una constante de ajuste con valores > 0 . Tras la transformación, el modelo cuadrático resultante comprendía 15 variables considerando las interacciones cuadráticas de cada uno de los factores. Debido a la complejidad del manejo de este tipo de modelos, se simplificó desarrollando una regresión por pasos ($\alpha_{\text{in/out}} = 0.1$), reduciendo el modelo a uno de cuatro variables. Este modelo reducido fue analizado por medio de una prueba ANOVA con un nivel de significancia del 10 %. Como se aprecia en el cuadro 18, el modelo resultó ser significativo ($P < 0.0001$, $F = 26.73$), sin falta de ajuste y con un coeficiente de determinación R^2 ajustado de 53.08 %; con base en estos resultados se prosiguió con el análisis. De los factores probados, sólo las concentraciones de fuente de carbono, su interacción cuadrática, así como la interacción cuadrática del extracto de levadura fueron significativos ($P < 0.0001$, $P = 0.0413$, $P = 0.0814$, respectivamente); sin embargo, se hizo un ajuste jerárquico para incluir la variable de concentración de extracto de levadura al modelo a pesar de no haber resultado significativa ($P = 0.1293$); con base en ello fue posible definir la ecuación que describe el comportamiento del modelo; esta se presenta como la ecuación 31.

$$LN(X) = -0.0726 + 0.0469C - 4.0271 \times 10^{-4}C^2 - 0.6067L + 0.0536L^2 \quad \text{Ecuación 31}$$

Donde $LN(X)$ corresponde al logaritmo natural de la biomasa (g L^{-1}), C a la concentración de fuente de carbono (proveniente de melazas de betabel) (g L^{-1}) y L a la concentración de extracto de levadura (g L^{-1}).

Cuadro #18: Análisis de varianza y resultados del diseño RSM para definir las condiciones óptimas para maximizar el crecimiento celular de probióticos (g L^{-1}) a partir del medio optimizado MBT. $\alpha = 0.10$.

Fuente	Suma de cuadrados	G. L.	Cuadrado medio	F	P
Modelo	7.81	4	1.95	26.73	< 0.0001
B: Fuente de carbono proveniente de betabel (g L^{-1})	7.20	1	7.20	98.57	< 0.0001
C: Extracto de levadura (g L^{-1})	0.17	1	0.17	2.35	0.1293
B²	0.31	1	0.31	4.29	0.0413
C²	0.23	1	0.23	3.11	0.0814
Residual	6.35	87	0.073		
Falta de ajuste	0.98	20	0.049	0.61	0.8901
Error	5.37	67	0.080		
Corr. Total	14.16	91	1.95	26.73	< 0.0001
R² ajustada	0.5308	R²	0.9191		

Al analizar el gráfico 3D del crecimiento (figura 43) se aprecia que la región de estudio se ubica entre dos valles, uno correspondiente para la concentración del extracto de levadura y otro, para la fuente de carbono. Con base en esta información, se procedió a calcular las condiciones óptimas de concentración de fuente de carbono proveniente de las melazas de betabel y del extracto de levadura, con el fin de maximizar el crecimiento celular; para ello, se corrió una función de optimización buscando maximizar el crecimiento celular, minimizando la cantidad de extracto de levadura por ser el reactivos más caro de la formulación y maximizando el extracto de té verde por

su aporte de compuestos fenólicos al medio de cultivo; la función se corrió sin ponderación, donde las mejores condiciones se muestran en el cuadro 19:

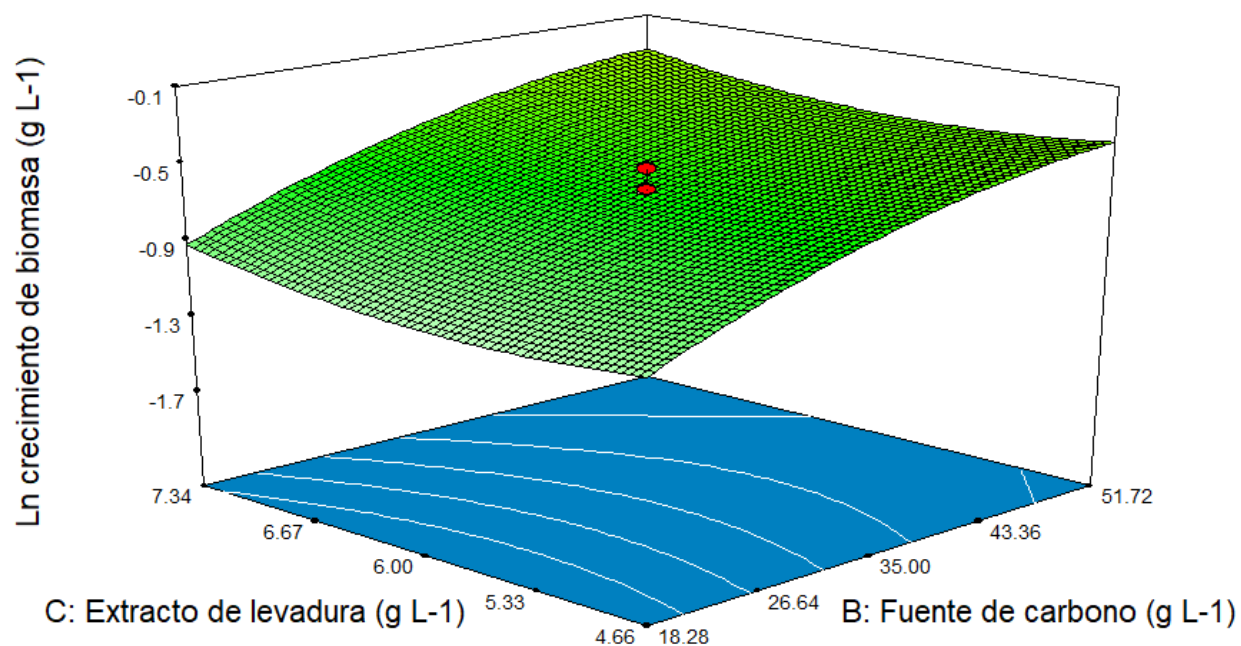


Figura 43: Gráfico 3D del crecimiento de biomasa en el medio MBT.

Cuadro #19: Condiciones optimizadas del diseño RSM para maximizar el crecimiento de probióticos a partir del medio MBT; deseabilidad = 80.8 %.

Fuente	Objetivo	Resultado
Ln Biomasa (g L⁻¹)	Maximizar	-0.384
A: pH	Mantener en rango	5.150
B: Fuente de carbono (g L⁻¹)	Mantener en rango	51.720
C: Extracto de levadura (g L⁻¹)	Minimizar	4.660
D: Extracto de té verde (mL L⁻¹)	Maximizar	8.670

Como se observa en el gráfico de contorno que describe la función de maximización de biomasa para el medio MBT (figura 44), hay dos regiones de maximización, una para el valor máximo optimizado (7.34 g L^{-1}) de extracto de levadura y otra para el valor mínimo optimizado (4.66 g L^{-1}) del mismo. Se decidió utilizar la región inferior para reducir el impacto del costo del medio de cultivo sin sacrificar, significativamente, crecimiento celular.

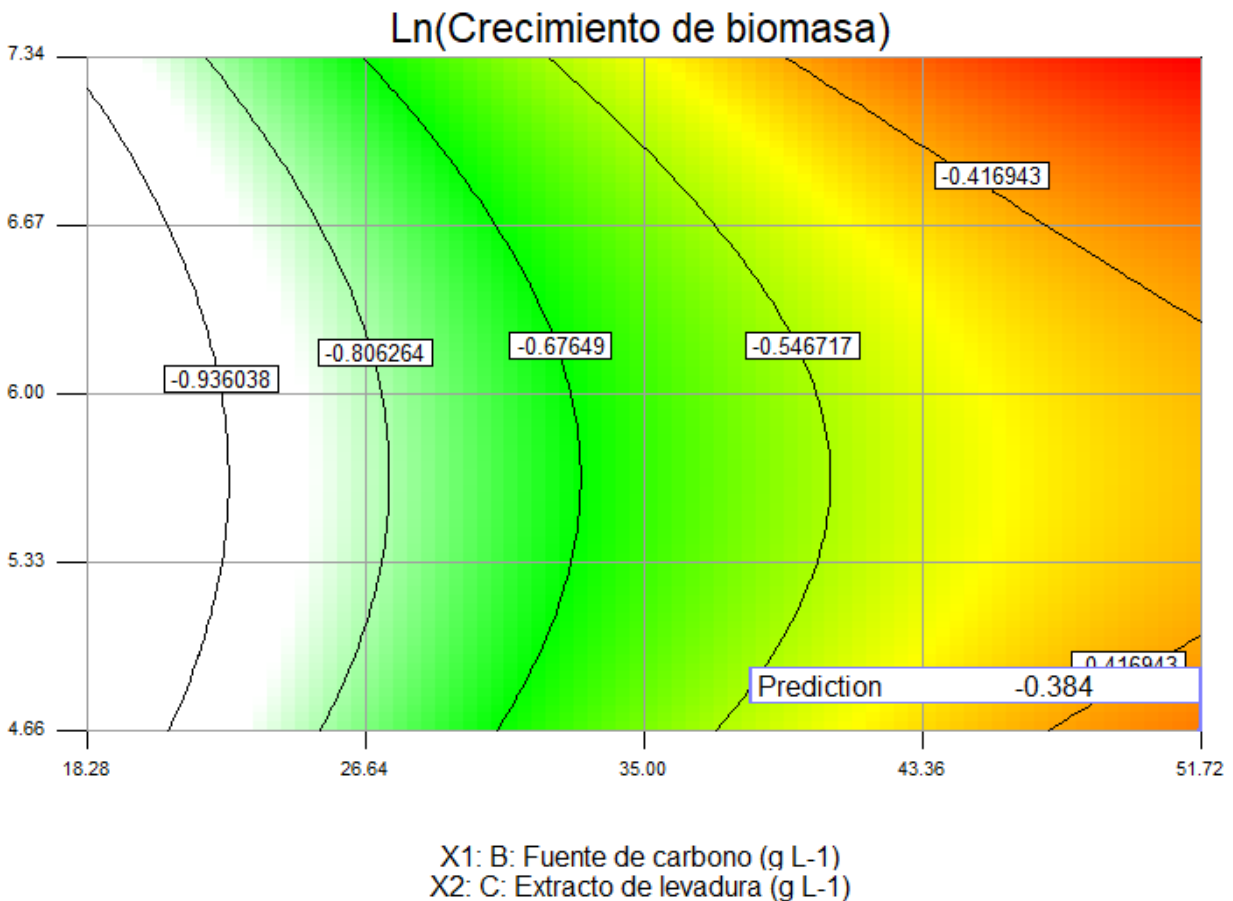


Figura 44: Gráfico de contorno donde se muestra la maximización de biomasa en función de las variables significativas (fuente de carbono – g L^{-1} –, extracto de levadura – g L^{-1}) con mejor deseabilidad (0.746)

Con base en la optimización fue posible calcular una relación de carbono:nitrógeno de, cuando menos, 7:1 (en el caso de la región máxima que describió la curva de optimización) hasta 11:1 (en el caso de la región mínima que describió la curva de optimización), manteniendo constante el pH a 5.15 y una concentración de extracto de té verde no menor a 8.67; al comparar contra resultados

de otros autores, como se aprecia en el cuadro #20, con el uso del medio MBT se presentó una disminución significativa en la cantidad de nitrógeno necesaria para el crecimiento microbiano de no menos de 14 % comparado contra otros autores, lo cual repercute, directamente, en costos de producción.

Cuadro #20: Comparación de la relación C:N reportados en este trabajo y en literatura para el crecimiento de microorganismos probióticos.

Parámetro	Este trabajo	Otros trabajos	Medio MRS
Relación C:N	7:1 – 11:1	3:1 ^[1] 6:1 ^[2]	1:1

1. Fu, W., & Mathews, A.P., “Lactic acid production from lactose by *Lactobacillus plantarum*: kinetic model and effects of pH, substrate, and oxygen”, *Biochemical Engineering Journal*, Vol. 3, p., 163 – 170, 1999.

2. Schepers, A. W., Thibault, J., & Lacroix, C., “*Lactobacillus helveticus* growth and lactic acid production during pH controlled batch cultures in whey permeate/yeast extract medium. Part I. multiple factor kinetic analysis”, *Enzyme and Microbial Technology*, Vol. 30, p., 176 – 186, 2002.

2.3.4.3. Diseño factorial 3² para la definición de las condiciones óptimas para la esterilización del medio MBT

Se generó un diseño factorial 3² (DesignExpert®, 11.0 Stat-Ease Minneapolis, MN) para definir las condiciones más adecuadas para minimizar la pérdida de contenido fenólico y garantizar la muerte microbiana del medio MBT. Los factores de prueba fueron: temperatura de esterilización (°C) y tiempo (min), y como variable de respuesta se midió el contenido de compuestos fenólicos (ppm) sólo en las corridas que no mostraron crecimiento microbiano después de llevar a cabo incubación del medio MBT en las diferentes combinaciones de esterilización por medio de conteo en placa; así mismo, el contenido fenólico se midió por medio del método de Folin-Ciocalteu. La corrida se efectuó por duplicado y el resumen de los resultados del diseño se muestra en el cuadro #21. Todas las combinaciones generadas en el diseño, así como los resultados de la prueba de contenido fenólico se pueden consultar en el anexo de este documento.

Cuadro #21: Características del diseño factorial 3² para definir las condiciones óptimas para la esterilización del medio MBT.

Parámetro	
Tipo de diseño	Factorial 3 ²
Diseño inicial	Factorial completo
Modelo	D-óptimo
Corridas	18
Bloques	0
Factor A	Temperatura (°C)
Factor B	Tiempo (h)
Respuesta	Contenido fenólico (ppm)

Se analizó el modelo como si fuera lineal, considerando las interacciones de los factores, con un nivel de significancia del 5 %. Como se aprecia en el cuadro 22, el modelo resultó ser significativo (P=0.0004) tras desarrollar la prueba ANOVA (F=12.78), sin falta de ajuste y con un coeficiente de determinación R² ajustado de 84.72 %; con base en estos resultados se prosiguió con el análisis. De los factores probados, sólo la temperatura resultó significativa (P<0.0001), mientras que el tiempo y las interacciones entre tiempo y temperatura no fueron significativas. La ecuación que describe el comportamiento del modelo se presenta como la ecuación 32.

$$C.F. = 4.080 \times 10^{-3} + 3.037 \times 10^{-4}T + 3.704 \times 10^{-6}t + 6.296 \times 10^{-5}T * t \quad \text{Ecuación 32}$$

Donde C.F. corresponde al contenido fenólico en ppm, T a la temperatura en °C y t, tiempo en minutos.

Cuadro #22: Análisis de varianza y resultados del diseño factorial 3^2 para definir las condiciones óptimas para la esterilización del medio MBT. $\alpha = 0.05$.

Fuente	Suma de cuadrados	G. L.	Cuadrado medio	F	P
Modelo	1.268×10^{-6}	8	1.585×10^{-7}	12.78	0.0004
A: Temperatura	1.143×10^{-6}	2	5.713×10^{-7}	46.04	< 0.0001
B: Tiempo	9.167×10^{-9}	2	4.583×10^{-9}	0.37	0.7012
AB	5.583×10^{-8}	4	1.396×10^{-8}	1.13	0.4032
Error	1.117×10^{-7}	9	1.241×10^{-8}	12.78	0.0004
Corr. Total	1.380×10^{-6}	17	1.585×10^{-7}		
R² ajustada	0.8472	R²	0.9191		

Como el término de tiempo no fue significativo, ni sus interacciones con la temperatura, se consideró sólo a ésta para reducir la ecuación de regresión a una sola variable. Con la ecuación reducida se calculó la temperatura óptima de esterilización con el fin de maximizar el contenido fenólico, la cual fue de 80 °C. Para la definición del tiempo óptimo de esterilización, se buscó que las placas inoculadas con medio MBT esterilizado a 80 °C no tuvieran crecimiento microbiano tras 24 h de incubación a 37 °C (para evaluar crecimiento de bacterias) o 72 h de incubación a 28 °C (para evaluar crecimiento de hongos y levaduras). Se observó que en las placas donde la esterilización se desarrolló durante 60 y 105 min no hubo crecimiento microbiano; de las combinaciones entonces de 80 °C y los tiempos 60 y 105 minutos, se corrió una función de optimización para maximización de compuestos fenólicos y minimización de tiempo, sin ponderación, donde las mejores condiciones de esterilización se muestran en el cuadro 23:

Cuadro #23: Condiciones optimizadas del diseño factorial 3^2 para maximizar la extracción de compuestos fenólicos a partir de la esterilización del medio MBT; deseabilidad = 87.5 %.

Fuente	Objetivo	Resultado
Contenido fenólico (ppm)	Maximizar	44.0
A: Temperatura (°C)	Mantener en rango	80.0
B: Tiempo (h)	Minimizar	60.0

2.3.4.4. Evaluación del impacto de metabolitos secundarios

Para garantizar el crecimiento de los microorganismos probióticos una vez se encontraran en consorcio, se hizo una prueba de sobrevivencia de los lactobacilos LR y LP en medio MBT adicionado con etanol (que es el principal metabolito generado por fermentación de SB) y de SB en medio MBT adicionado con ácido láctico (que es el principal metabolito generado por fermentación de LR y LP). Para ello, se hizo pruebas a cinco concentraciones de los metabolitos secundarios en las condiciones óptimas de crecimiento de cada microorganismo, de acuerdo con la información del cuadro #24 y #25. Todas las corridas se efectuaron por quintuplicado.

Cuadro #24: Características de la prueba para evaluar el impacto de los metabolitos secundarios (ácido láctico) sobre el crecimiento de SB ($> 1 \times 10^8$ UFC mL⁻¹).

Parámetro	Respuesta
Medio de cultivo	YPD
Ácido láctico	{0, 5, 10, 15, 20} % v/v
Inóculo	10 % v/v
Temperatura	30 °C

Tiempo de incubación	24 h
Agitación	250 RPM
Réplicas	Quintuplicado

Cuadro #25: Características de la prueba para evaluar el impacto de los metabolitos secundarios (ácido láctico) sobre el crecimiento de SB ($> 1 \times 10^8$ UFC mL⁻¹).

Parámetro	Respuesta
Medio de cultivo	MRS
Etanol	{0, 5, 10, 15, 20} % v/v
Inóculo	10 % v/v
Temperatura	37 °C
Tiempo de incubación	24 h
Agitación	0 RPM
Réplicas	Quintuplicado

Una vez efectuadas las corridas, utilizando Minitab® 18 se generó una función de sobrevivencia por medio de una regresión Probit para calcular la concentración media para la supervivencia de, al menos, 80 % de cada especie microbiana. Los resultados estadísticos se muestran en el cuadro 26, donde se aprecia que para el caso de los lactobacilos LR y LP, la concentración media

inhibitoria fue de 19.87 % (v/v) de etanol, mientras que para la levadura SB, se encontró una concentración media inhibitoria de 12.50 % (v/v) de etanol, ambos valores muy por arriba de los encontrados durante las fermentaciones a nivel piloto en proceso por lote y lote alimentado. Sólo en el caso del crecimiento de la levadura se observó un efecto significativo sobre su crecimiento, por lo que se debe tener particular cuidado de mantener en estado de crecimiento al microorganismo sin permitir la acumulación de ácido láctico en el medio.

Cuadro 26: Resultados del análisis PROBIT de supervivencia de microorganismos probióticos (LP, LR y SB) en presencia de metabolitos secundarios a distintas concentraciones. $\alpha = 0.5$.

Microorganismo	Metabolito	MTTF (% v/v)	σ (% v/v)	Z- value	P- value
LP – LR	Etanol	19.8729	6.2131	1.86	0.062
SB	Ácido láctico	12.5000	2.7644	2.02	0.043

El comportamiento gráfico de las dos pruebas se aprecia en las figuras 45 (para LP-LR) y 46 (SB), respectivamente.

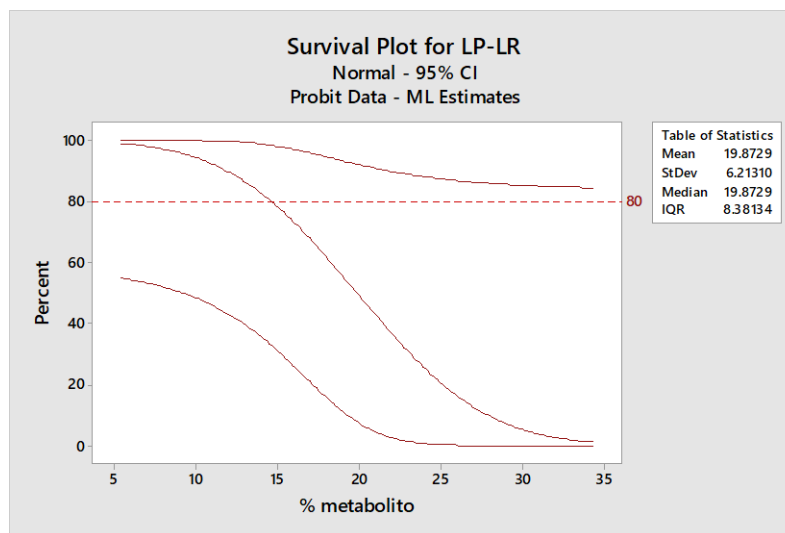


Figura 45: Gráfico de supervivencia de LP-LR (crecidos en MRS durante 24 h de incubación a 37 °C, 0 RPM) en presencia de etanol (% v/v) a diferentes concentraciones. $\alpha = 0.5$.

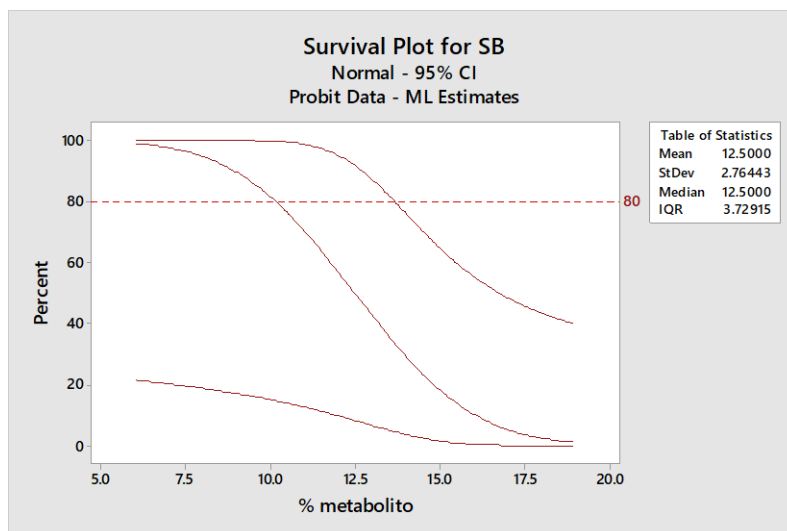


Figura 46: Gráfico de supervivencia de SB (crecido en YPD durante 24 h de incubación a 30 °C, 250 RPM) en presencia de ácido láctico (% v/v) a diferentes concentraciones. $\alpha = 0.5$.

2.3.4.5. Caracterización fisicoquímica y microscópica del medio

MBT y de los microorganismos LP, LR y SB

Tras haber evaluado y concluido que el medio MBT era adecuado para maximizar el crecimiento de los microorganismos probióticos, se procedió con la caracterización fisicoquímica y microscópica del medio MBT y de los microorganismos probióticos. Los resultados fisicoquímicos se muestran en el cuadro 27 donde se muestran las principales características de relevancia del medio preparado para una posterior caracterización reológica en el escalamiento a nivel industrial, así como una imagen del medio final como referencia (figura 47):



Figura 47: Medio MBT (fotografía de autoría propia).

Cuadro 26: Parámetros fisicoquímicos resultantes de la caracterización del medio de cultivo MBT

Parámetro	Respuesta
Densidad (g mL ⁻¹)	1.0165 ± 0.0005
Viscosidad (cP, 25°C)	15.2250 ± 0.5439
Sólidos solubles (% p/v)	10.6250 ± 0.4787
Carbohidratos reductores (g L ⁻¹)	12.3780 ± 0.4460
Carbohidratos totales (g L ⁻¹)	48.3343 ± 0.6728
Contenido fenólico total (ppm)	39.4158 ± 2.6282

Así mismo, se hizo una observación microscópica de los cultivos axénicos crecidos en medio MBT para observar células viables. Las observaciones se efectuaron por medio de un microscopio Motic® DMB1-223 utilizando una amplificación de 100 x con aceite de inmersión 10x, sin contraste, las cuales se muestran como las figuras 48 (para LR y LP) y 49 (para SB).

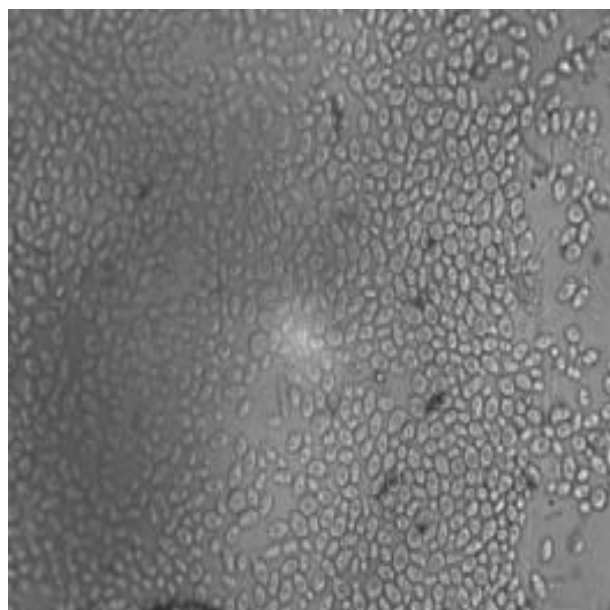


Figura 49: Micrografía (1000X) del cultivo axénico de SB crecido en medio MBT (Carranza, Martínez, & Vergara, 2018).

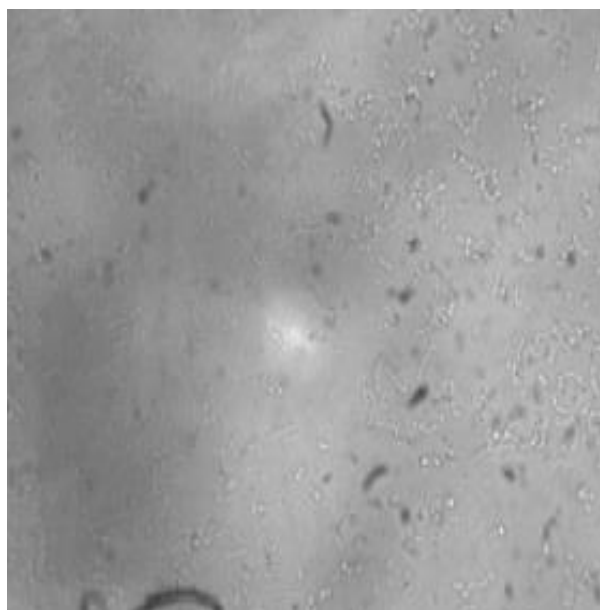


Figura 48: Micrografía (1000X) del cultivo de LP – LR crecidos en medio MBT (Carranza, Martínez, & Vergara, 2018).

2.4.MEJORA Y CONTROL

2.4.1. Resultado de las mejoras implementadas durante el escalamiento del proceso de producción de probióticos por CCLA y análisis de modo y efecto de falla (AMEF)

Tras optimizar el medio, analizar los resultados de las corridas cinéticas y aplicación de la metodología LEAN/DMAIC, se pudieron obtener múltiples resultados sobre el proceso, los cuales se muestran a manera de resumen en el cuadro 27. Se indica la etapa de proceso sobre el cual se aplicó la mejora, su descripción, y qué herramienta fue la aplicada.

Cuadro 26: Resumen de las mejoras implementadas hasta el momento en función de la herramienta / etapa del proceso efectuado.

Parámetro	Mejora	Etapa del proceso	Herramienta implementada
Materiales y componentes del proceso	Se efectuó una clasificación y ordenamiento de los materiales de las 4 actividades del proceso.	Flujo continuo (Lean)	5's
Lista de verificación de limpieza	Se generó un listado de materiales y frecuencias de limpieza para las 4 actividades del proceso.	Flujo continuo (Lean)	5's
Estandarización y optimización del proceso	Reducción de 2 actividades de VA y 2 inspecciones equivalente a 5.35 % de tiempo de ciclo.	Flujo continuo (Lean)	5's, DFP, VSM

Análisis de brechas y balance de cargas	Se redujo el número de operadores a 2, reduciendo en 47.62 % las brechas contra <i>pitch</i> .	Balance (<i>Lean</i>)	<i>Takt-time</i> , GAP <i>analysis</i>
Plan de colección de datos	Se definieron las variables del proceso y se estandarizó la metodología de análisis.	Medición (<i>Six Sigma</i>)	Matriz X Y
Rendimiento y optimización	Se igualó el rendimiento celular de los medios comerciales MRS y YPD a partir del medio MBT y se estableció una relación de C:N de 7:1 a 11:1.	Medición y análisis (<i>Six Sigma</i>)	DoE, Análisis de regresión
Elección del bioproceso	Se pudo establecer que el bioproceso en cultivo por lote alimentado es 29.84 % más productivo que el continuo.	Medición y análisis (<i>Six Sigma</i>)	Control de proceso, ANOVA

Para robustecer el proyecto, y poder definir acciones de mejora futuras, se hizo un análisis de modo de falla (AMEF) basado en los resultados obtenidos durante el escalamiento y definiendo como pasos clave del proceso cada una de las etapas del diagrama de flujo de proceso mientras que la severidad, probabilidad de ocurrencia y probabilidad de detección se establecieron, con base en una escala numérica ascendente (mínimo 1, máximo 5) basados en la experiencia de detección de

cada falla durante el proceso a nivel laboratorio (biorreactor de 0.25 L) y su escalamiento a nivel piloto (biorreactor de 7.0 L). La matriz completa se puede apreciar en la figura 50. Tras definir estos tres indicadores, el resultado de la falla se calculó como el producto de cada indicador; aquellas fallas potenciales con un indicador NPR superior a 40 se definieron como críticos, encontrando solamente cuatro potenciales fallas críticas:

- Caracterización del medio de cultivo, debido a problemas de calibración de instrumentos y mala ejecución de técnicas analíticas.
- Acondicionamiento de los biorreactores, debido a una mala calibración y/o falta de mantenimiento.
- Fermentación del cultivo continuo-lote alimentado, por problemas del sistema de salida/alimentación por falta de mantenimiento y
- Caracterización de productos de fermentación por errores de medición.

Para atacar las potenciales fallas se hicieron las siguientes propuestas:

1. Ejecutar mantenimientos preventivos y validaciones internas.
2. Establecer y evaluar el seguimiento de procedimientos y mediciones de parámetros de proceso.
3. Desarrollar mediciones y mantenimientos periódicos a los equipos para reducir riesgo de falla.

De esta manera se detecta la necesidad de establecer un plan de mantenimiento preventivo de equipos ya accesorios durante la etapa de escalamiento a nivel industrial, así como generar los procedimientos para cada uno de los procesos una vez logrado el escalamiento.

Análisis de Modo y Efecto de la Falla															
Nombre de Proceso o Producto:		Producción de probióticos por CCLA a escala laboratorio (7 L)						Elaborado por:		José Carlos Peña Partida		Página:		1 de 1	
Encargado:		José Carlos Peña Partida						FMEA Fecha (Orig):		05/12/2018		Rev.		1	
Pasos Clave del Proceso	Modos de Falla Potenciales	Efectos de Fallas Potenciales	S E V	Causas Potenciales	C O C	Controles de Ocurrencia	D E T	N P R	Acciones Recomendadas	Responsable	Acciones implementadas	S E V	C O C	D E T	N P R
¿Cuál es el paso del proceso?	¿De qué maneras puede fallar dicho paso del proceso?	¿Cuál es el impacto de las variables de los pasos clave cuando hay un fallo (cliente o requerimientos internos)?	¿Qué tan seguro es el efecto para el cliente?	¿Qué causa que el paso clave falle?	¿Qué tan seguro ocurre la causa o Modo de Fallo?	¿Cuáles son los controles existentes y procedimientos preventivos de Causa o Modo de Fallo?	¿Qué tan fiable es el detector de la Causa o Modo de Fallo?		¿Cuáles son las acciones para reducir la Ocurrencia de la Causa o mejorar la Detección?	¿Quién es responsable de las acciones recomendadas?	Anotar las acciones implementadas. Incluye fecha de completación.				
Recepción de materias primas	1. Cantidades incompletas. 2. Documentación inadecuada.	1. Lotes de producción incompletos. 2. Rechazo.	2 2	1,2. Revisión / comunicación con proveedor.	1 1	1,2. Revisión de OC y OR.	1 1	2 2	Validar la OC y OR (crosscheck) contra sistema.						0
Inspección de materias primas	1. MP de mala calidad. 2. Materiales distintos a lo solicitado. 3. MP fuera de parámetros.	1. 3. MP fuera de especificaciones. 2. Rechazo.	3 2	1,2,3. Revisión con proveedor.	1 2	1, 2, 3. Especificaciones e inspección.	2 1	6 4	Validar contra especificaciones y medir parámetros de aceptación.						0
Acondicionamiento de materias primas	1. Mala sanitización. 2. Sobre almacenamiento. 3. Cantidades incompletas.	1. Contaminación cruzada. 2. Producto echado a perder. 3. PI fuera de especificaciones de calidad.	5 4 3	1. Equipo / proceso inadecuado. 2. Mal control de inventarios. 3. Mal proceso / capacitación.	3 1 3	1. Trabajo en zonas estériles. 2. Registro y control de inventarios. 3. Estandarización de técnicas.	3 2 3	45 8 27	Cuidado de trabajar en zonas asépticas y validar contra especificaciones.						0
Elaboración de medio MBT	1. PI fuera de parámetros. 2. Producto quemado. 3. Producto mal mezclado.	1. PI fuera de especificaciones. 2. Desecho. 3. Reproceso.	3 4 4	1. Mal proceso / capacitación. 2. Proceso inadecuado. 3. Proceso inadecuado.	3 4 2	1, 2, 3. Caracterización del medio.	1 1 2	6 20 16	Seguir procedimientos y medir parámetros de proceso.						0
Caracterización de medio MBT	1. Equipo no calibrado. 2. Problemas con la técnica analítica. 3. Mala ejecución técnica.	1, 2, 3. Error en medición.	4	1. Mal programa de mantenimiento. 2, 3. Mala capacitación.	3	1. Programa de mantenimiento. 2, 3. Estandarización de técnicas.	4	48	Ejecutar mantenimientos preventivos y validaciones internas.						0
Precultivos y acondicionamiento de MO's	1. Células no viables. 2. Contaminación de los medios. 3. Crecimiento pobre. 4. Condiciones de incubación inadec.	1. Reproceso. 2. Reproceso. 3, 4. Aumento en tiempo y materiales.	4 4 4	1. MP con defecto. 2. Mal proceso / capacitación. 3,4. Proceso inadecuado.	3 3 3	1, 3. Técnicas de conteo. 2. Trabajo en condiciones de esterilidad. 4. Procedimiento y verificación.	3 3 2	36 24 24	Control del proceso y mediciones periódicas para reducir riesgo de falla.						0
Acondicionamiento de reactores	1. Tubería o válvulas mal colocadas. 2. Llenado inadecuado. 3. Falta de calibración.	1. Fugas / contaminación. 2. Bajo rendimiento. 3. Error en medición.	5 4 4	1,2. Mala capacitación. 3. Mal programa de mantenimiento.	1 3	1. Visual / capacitación. 2. Visual. 3. Programa de mantenimiento.	4 1 4	20 4 48	Seguir procedimientos y medir parámetros de proceso.						0
Esterilización de reactores con medio MBT	1. Condiciones de T, t inadecuadas. 2. Contaminación del sistema.	1. Rendimiento y productividad variables. 2. Desperdicios.	4 4	1. Mala capacitación. 2. Mal proceso / capacitación.	2 1	1. Parámetros de proceso. 2. Trabajo en condiciones de esterilidad.	2 3	16 12	Seguir procedimientos y medir parámetros de proceso.						0
Inoculación de reactores	1. Contaminación por mal manejo. 2. Contenido celular bajo. 3. Derrames por presurización.	1. Desperdicios. 2,3. Reproceso.	4 4	1. Mal proceso / capacitación. 2. Proceso inadecuado. 3. Mal proceso / capacitación.	1 2	1. Trabajo en zonas de esterilidad. 2. Estandarización del proceso.	3 2	12 16	Cuidado de trabajar en zonas asépticas y validar contra especificaciones.						0
Fermentación en CCLA	1. Contaminación durante muestreo. 2. Problemas con parámetros de control. 3. Problemas con sistema de alimentación/salida. 4. Fallo en equipo de medición.	1. Desperdicios. 2. Error en medición. 3. Fugas / derrames. 4. Producto fuera de especificaciones.	4 4 5 4	1,2. Mal proceso / capacitación. 3. Proceso inadecuado. 4. Falta de programa de mantenimiento.	1 4 5 2	1. Trabajo en zonas de esterilidad. 2. Estandarización del proceso. 3,4. Mantenimiento de equipo.	3 2 4	12 32 100 16	Cuidado de trabajar en zonas asépticas y desarrollar mediciones periódicas para reducir riesgo de falla.						0
Caracterización de productos de fermentación	1. Equipo no calibrado. 2. Problemas con la técnica analítica. 3. Mala ejecución técnica.	1, 2, 3. Error en medición.	4	1. Mal programa de mantenimiento. 2, 3. capacitación.	3	1. Programa de mantenimiento. 2, 3. Estandarización de técnicas.	4	48	Ejecutar mantenimientos preventivos y validaciones internas.						0
Cosecha de biomasa	1. Contaminación por mal manejo. 2. Mala operación – > Mala separación celular.	1. Desperdicios. 2. Reproceso.	4 4	1. Mala capacitación. 2. Mal proceso / capacitación.	1 1	1. Trabajo en zonas de esterilidad. 2. Parámetros de proceso.	3 2	12 8	Seguir procedimientos y medir parámetros de proceso.						0

Figura 50: Análisis de modo de falla (AMEF) del proceso de producción de probióticos por CCLA

3.1.1. Análisis y comparación de costos de medios de cultivo

Finalmente, se hizo un análisis de los costos de elaboración y materiales del medio MBT y comparándolo contra medios comerciales. En la figura 51 se aprecia que el medio MBT, a la fecha de elaboración de este reporte, representa un costo por kg de \$91.38 contra \$216.34 y \$246.45 de los medios MRS y YPD, comerciales. Los costos del medio MBT se calcularon a partir de los materiales adquiridos en la central de abastos de la ciudad de Guadalajara, y medios comerciales de marca Sigma-Aldrich. Comparando los precios de cada uno de estos medios, observamos que el MBT representa una reducción de 57.76 % en comparación contra el medio MRS y una reducción de 62.92 % comparado contra el medio YPD, lo cual vuelve económicamente viable a este medio para su uso y comercialización.

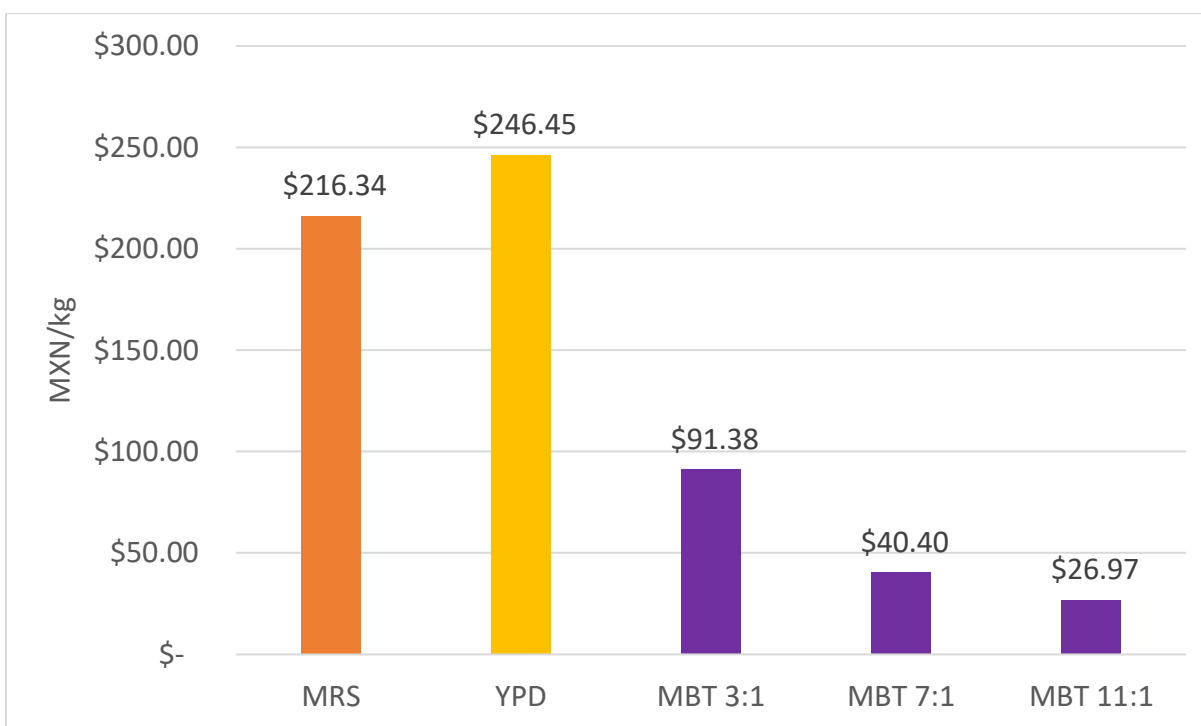


Figura 51: Análisis de costos (MXN/kg) de medios de cultivo MRS (Sigma-Aldrich), YPD (Sigma-Aldrich) y medio MBT con tres relaciones C:N

CAPÍTULO VII
CONCLUSIONES

- Pudo implementarse la metodología Lean para este proyecto en sus tres etapas, definición, flujo continuo y balance.
- Se optimizó el proceso de producción de probióticos en su escalamiento a 7 L, reduciendo 4 actividades lo que representa una mejora de 5.39 % en tiempo de proceso.
- A partir del QFD fue posible identificar siete requerimientos de los clientes y establecer relaciones entre estos y los requerimientos técnicos del proceso.
- Se pudo identificar que el medio de cultivo era el principal contribuyente para lograr los requerimientos técnicos y la satisfacción del cliente por medio del QFD.
- Por medio del mapeo de cadena de valor se pudo cuantificar el FPY del proceso, de 0.62 %, el tiempo de valor agregado del proceso de 0.8 días totales, el tiempo de no valor agregado del proceso, de 44 días totales y una confiabilidad del sistema de 99%.
- Se encontraron dos actividades (precultivos y fermentación) que fueron operadas en paralelo con respecto del proceso central reduciendo así el cálculo del *Takt-time* hasta 1.71 h y de *pitch* a 12 h.
- Con base en las mejoras propuestas, se disminuyó balanceó la carga de trabajo a sólo 2 operadores, con una reducción del 50 % contra el proceso original y se redujeron las brechas entre los operadores contra el *pitch* del proceso hasta 55.41 y 39.83 %, es decir, una disminución de 47.62 % con respecto a la distribución de cargas de trabajo original.
- Tras la estandarización del proceso y la implementación de las 5's se obtuvo una mejoría equivalente a 52 % de implementación de la estrategia.
- Se definieron los retos, objetivos, alcance, impacto y métricas del proyecto a partir de la construcción del *Project Charter*.

- Se estableció un plan de colección de datos para el proceso de producción de probióticos en el cual se identificaron las variables independientes y dependientes de éste.
- Se encontró que el mejor modelo que describía el comportamiento cinético de crecimiento de LP, LR y SB fue el modelo de Weibull, con base en sus coeficientes de determinación R^2 ajustada superiores, en todos los casos a 0.9, con un nivel de significancia de 0.05, para los medios comerciales, y de Richards, para los medios con MBT.
- A partir de los modelos linealizados, fue posible definir la velocidad específica de crecimiento (μ_{\max}), la constante de afinidad por sustrato (K_s), el rendimiento global de generación de biomasa en función del consumo de sustrato (YX/S) y el rendimiento global de generación de producto en función del consumo de sustrato (YP/S).
- Las bacterias destinaron cerca del 50 % de su fuente de carbono para condiciones de mantenimiento y funciones metabólicas, con cerca del 30 % de producción de ácido láctico. La levadura destinó el 100 % de su fuente de carbono para crecimiento.
- Por medio de los diseños factoriales fue posible establecer las combinaciones óptimas de tiempo y temperatura para la esterilización del medio de cultivo, en 80 °C y 60 minutos.
- Por medio de los diseños factoriales fue posible establecer las combinaciones óptimas de extracción de té verde, en 94 °C y 3 minutos, independientemente de su concentración.
- Se encontró que el ácido láctico tiene un efecto significativo sobre el crecimiento de la levadura SB, mientras que el etanol no, sobre las bacterias LP y LR, con una concentración media a la falla de 12.5 % para el primero y de 19.87 % para el segundo.
-
- A partir del SRM fue posible encontrar las combinaciones óptimas para la formulación del medio MBT donde sólo la relación C:N 7:1 a 11:1 tuvieron un efecto significativo sobre el crecimiento de biomasa probiótica.

- Se obtuvieron concentraciones celulares (UFC) de los microorganismos probióticos crecidos en el medio MBT similares a las obtenidas en los medios comerciales ($>10^9$ UFC mL⁻¹) con remanencia de más de 30 mg L⁻¹ de compuestos fenólicos totales, lo que permite clasificar a la mezcla como simbiótico.
- Con base en los rendimientos celulares se pudo calcular una reducción de costos por medio de cultivo de, al menos, 57 % con respecto a los medios comerciales.
- Se encontraron diferencias significativas entre los procesos de producción de probióticos en cultivos continuos y lote alimentado, resultando el segundo superior en 28 % de rendimiento celular.
- Se definió que el proceso de producción de probióticos en cultivos continuos y lote alimentado describen un comportamiento normal, con capacidades de proceso en todos los casos inferiores a 1.33, lo cual es un indicador que existen parámetros que no se están controlando que afecta la productividad; así mismo, se definió el nivel sigma para los procesos resultando ser de 2, equivalente a 308000 DPPM's.

BIBLIOGRAFÍA

- Aguirre-Ezkauriatza, E. J., Aguilar-Yáñez, J. M., Ramírez-Medrano, A., & Álvarez, M. M. (2010). Production of probiotic biomass (*Lactobacillus casei*) in goat milk whey: Comparison of batch, continuous and fed-batch cultures. *Bioresource Technology*, 101, 2837 - 2844.
- Almquist, J., Cvijovic, M., Hatzimanikatis, V., Nielsen, J., & Jirstrand, M. (2014). Kinetic models in industrial biotechnology – Improving cell factory performance. *Metabolic Engineering*, 24, 38 - 60.
- American Diabetes Association. (2014). Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. *Diabetes Care*, 37(1), S81 - S90.
- American Society for Testing and Materials. (1996). Standard test method for determination of total solids in biomass. En A. S. Materials, *Annual Book of ASTM Standards* (Vol. 11, págs. 1293 - 1295). ASTM.
- American Society of Testing Materials (ASTM). (2015). *ASTM D1217 - 15 Standard Test Method for Density and Relative Density (Specific Gravity) of Liquids by Bingham Pycnometer*. West Conshohocken: ASTM International.
- American Society of Testing Materials (ASTM). (2018). *ASTM D6080 - 18a Standard Practice for Defining the Viscosity Characteristics of Hydraulic Fluids*. West Conshohocken: ASTM International.
- Arumugam, M., Raes, J., Pelletier, C., Le Paslier, D., Yamada, T., Mende, D. R., . . . Bork, P. (2011). Enterotypes of the human gut microbiome. *Nature*, 473, 174 - 180.
- Asemi, Z., Zare, Z., Shakeri, H., Sabihi, S., & Esmailzadeh, A. (2013). Effect of Multispecies Probiotic Supplements on Metabolic Profiles, hs-CRP, and Oxidative Stress in Patients with Type 2 Diabetes. *Annals of Nutrition and Metabolism*, 63, 1 - 9.
- Axelsson, L. (2004). Lactic Acid Bacteria: Classification and Physiology. En S. Salminen, A. von Wright, & A. Ouwehand, *Lactic Acid Bacteria - Microbiological and Functional Aspects* (págs. 19 - 85). New York: Marcel Dekker, Inc.

- Azofeifa-Delgado, Á. (2006). Uso de marcadores moleculares en plantas; aplicaciones frutales del trópico. *Agronomía Mesoamericana*, 17(2), 221 - 242.
- Badawi, A., Klip, A., Haddad, P., Cole, D. E., Garcia-Bailo, B., El-Sohemy, A., & Karmali, M. (2010). Type 2 diabetes mellitus and inflammation: Prospects for biomarkers of risk and nutritional intervention. *Diabetes, Metabolic Syndrome and Obesity: Targets and Therapy*, 3, 173 - 186.
- Borshchevskaya, L. N., Gordeeva, T. L., Kalinina, A. N., & Sineokii, S. P. (2016). Spectrophotometric Determination of Lactic Acid. *Journal of Analytical Chemistry*, 71(8), 755 - 758.
- Butel, M. J. (2014). Probiotics, gut microbiota and health. *Médecine et maladies infectieuses*, 1 - 8.
- Cantera, S. (06 de 05 de 2016). *Cartera de Negocios*. Recuperado el 07 de 10 de 2018, de El Universal: <http://www.eluniversal.com.mx/articulo/cartera/negocios/2016/05/6/merck-apuesta-al-segmento-de-los-probioticos-en-mexico>
- Dalgaard, P., & Koutsoumanis, K. (2001). Comparison of maximum specific growth rates and lag times estimated from absorbance and viable count data by different mathematical models. *Journal of Microbiological Methods*, 43, 183 - 196.
- Dandona, P., Aljada, A., & Bandyopadhyay, A. (2004). Inflammation: the link between insulin resistance, obesity and diabetes. *Trends in Immunology*, 25(1), 4 - 7.
- Delzenne, N. M., Neyrinck, A. M., Bäckhed, F., & Cani, P. D. (2011). Targeting gut microbiota in obesity: effects of prebiotics and probiotics. *Nature Reviews Endocrinology*, 7, 639 - 646.
- DePalma, A. (15 de octubre de 2015). *Special Report: Turning Discoveries into Products — Developability Assessments and Highly Efficient Process Design*. Recuperado el 19 de octubre de 2018, de BioProcess International: <https://bioprocessintl.com/analytical/cell-line-development/special-report-turning-discoveries-into-products-developability-assessments-and-highly-efficient-process-design/>
- Dirección General de Evaluación del Desempeño - Subsecretaría de Integración y Desarrollo del Sector Salud. (2015). *Informe sobre la salud de los mexicanos 2015 - Diagnóstico general de la salud poblacional*. México D.F.: Secretaría de Salud.

- Duitama-Castellanos, J. A. (2010). *Bioinformatics Methods for Diagnosis and Treatment of Human Diseases*. Connecticut: University of Connecticut.
- Eckburg, P. B., Bik, E. M., Bernstein, C. N., Purdom, E., Dethlefsen, L., Sargent, M., . . . Relman, D. A. (2005). Diversity of the Human Intestinal Microbial Flora. *Science*, 308, 1635 - 1638.
- Ejtahed, H. S., Mohtadi-Nia, J., Homayouni-Rad, A., Niafar, M., Asghari-Jafarabadi, M., Mofid, V., & Akbarian-Moghari, A. (2011). Effect of probiotic yogurt containing *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium lactis* on lipid profile in individuals with type 2 diabetes mellitus. *Journal of Dairy Science*, 94(7), 3288 - 3294.
- Federación Mexicana de Diabetes. (mayo de 2016). Síndrome metabólico y diabetes. *Diabetes tipo 2*. Recuperado el 22 de octubre de 2017, de <http://fmdiabetes.org/sindrome-metabolico-diabetes/>
- Feist, A. M., & Palsson, B. (2008). The growing scope of applications of genome-scale metabolic reconstructions using *Escherichia coli*. *Computational Biology*, 26(6), 659 - 667.
- Fleming, R. A. (2001). The Weibull model and an ecological application: describing the dynamics of foliage biomass on Scots pine. *Ecological Modelling*, 138, 309 - 319.
- Food and Agriculture Organization of the United Nations. (2001). *Probiotics in food - Health and nutritional properties and guidelines for evaluation*. Roma: WHO/FAO.
- GBD 2015 Risk Factors Collaborators. (2016). Global, regional, and national comparative risk assessment of 79 behavioural, environmental and occupational, and metabolic risks or clusters of risks, 1990–2015: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2015. *Lancet*, 388, 1659 - 1724.
- Gibson, G. R., & Roberfroid, M. B. (1995). Dietary modulation of the human colonic microbiota: introducing the concept of prebiotics. *Journal of Nutriology*, 125, 1401 - 1412.
- Gibson, G. R., Hutkins, R., Sanders, M. E., Prescott, S. L., Reimer, R. A., Salminen, S. J., . . . Reid, G. (2017). The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics (ISAPP) consensus statement on the definition and scope of prebiotics. *Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology*, 1 - 12.

- Global Market Insights. (2017). *Probiotics Market Report, 2024*. Selbyville: Global Market Insights.
- Gøbel, R. J., Larsen, N., Jakobsen, M., Mølgaard, C., & Fleischer-Michaelsen, K. (2012). Probiotics to Adolescents With Obesity: Effects on Inflammation and Metabolic Syndrome. *JPGN*, 55(6), 673 - 678.
- Gutiérrez-García, J. G. (2015). *Utilización de prebióticos naturales como potencializadores de crecimiento y viabilidad de B. animalis en suero de leche bovina* (Vol. 1). Tlaquepaque, Jalisco, México: REI - ITESO.
- Horgan, R. P., & Kenny, L. C. (2011). "Omic" technologies: genomics, transcriptomics, proteomics and metabolomics. *The Obstetrician & Gynaecologist*, 13, 189 - 195.
- Hutkins, R. W., Krumbeck, J. A., Bindels, L. B., Cani, P. D., Fahey Jr., G., Goh, Y. J., . . . Sanders, M. E. (2016). Prebiotics: why definitions matter. *Curr Opin Biotechnol*, 37, 1 - 7.
- Instituto Nacional de Estadística, Geografía e Informática. (2017). *Estadísticas a propósito del día mundial de la población*. Aguascalientes: INEGI.
- International Diabetes Federation. (2006). *The IDF consensus worldwide definition on the metabolic syndrome*. Bruselas: IDF Communications.
- Kadooka, Y., Sato, M., Imaizumi, K., Ogawa, A., Ikuyama, K., Akai, Y., . . . Tsuchida, T. (2010). Regulation of abdominal adiposity by probiotics (*Lactobacillus gasseri* SBT2055) in adults with obese tendencies in a randomized controlled trial. *European Journal of Clinical Nutrition*, 64, 636 - 643.
- Kailasapathy, K., & Chin, J. (2000). Survival and therapeutic potential of probiotic organisms with reference to *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium* spp. *Immunology and Cell Biology*, 78, 80 - 88.
- Karki, G. (31 de Julio de 2017). *One Biology Notes*. Recuperado el 24 de Marzo de 2018, de Different Fermentation pathway of bacteria: <http://www.onlinebiologynotes.com/different-fermentation-pathway-bacteria/>

- Karlsson-Videhult, F., Öhlund, I., Stenlund, H., Hernell, O., & West, C. E. (2015). Probiotics during weaning: a follow-up study on effects on body composition and metabolic markers at school age. *European Journal of Nutrition*, 54(3), 355 - 363.
- Korzun, V. (2002). Use of molecular markers in cereal breeding. *Cell Mol Biol Lett*, 7(2B), 811 - 820.
- Ley, R. E., Turnbaugh, P. J., Klein, S., & Gordon, J. I. (2006). Human gut microbes associated with obesity. *Nature*, 444(21), 1022 - 1023.
- López, S., Prieto, M., Dijkstra, J., Dhanoa, M. S., & France, J. (2004). Statistical evaluation of mathematical models for microbial growth. *International Journal of Food Microbiology*, 96, 289 - 300.
- Luoto, R., Kalliomäki, M., Laitinen, K., & Isolauri, E. (2010). The impact of perinatal probiotic intervention on the development of overweight and obesity: follow-up study from birth to 10 years. *International Journal of Obesity*, 1 - 7.
- Malaguarnera, M., Vacante, M., Antic, T., Giordano, M., Chisari, G., Acquaviva, R., . . . Galvano, F. (2012). Bifidobacterium longum with Fructo-Oligosaccharides in Patients with Non Alcoholic Steatohepatitis. *Digestive Diseases and Sciences*, 57(2), 545 - 553.
- McGurk, T. L. (2009). Ramping Up and Ensuring Supply Capability for Biopharmaceuticals. *BioPharm International*, 17(1), 1 - 4.
- McMeekin, T. A., & Ross, T. (2002). Predictive microbiology: providing a knowledge-based framework for change management. *International Journal of Food Microbiology*, 78, 133 - 153.
- Mendenhall, W., & Sincich, T. (2012). *A Second Course in Statistics - Regression Analysis* (7a ed.). Boston, EE.UU.: Pearson Prentice Hall.
- Mera, I. (28 de noviembre de 2018). ¿Te preocupa que el dólar siga subiendo con AMLO? Esto dice Banxico. Obtenido de El Financiero - Mercados: <http://www.elfinanciero.com.mx/mercados/te-preocupa-que-el-dolar-siga-subiendo-con-amlo-esto-dice-banxico>

- Miller, G. L. (1959). Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. *Analytical Chemistry*, 31(3), 426 - 428.
- Million, M., Maraninchi, M., Henry, M., Armougom, F., Richet, H., Carrieri, P., . . . Raoult, D. (2012). Obesity-associated gut microbiota is enriched in *Lactobacillus reuteri* and depleted in *Bifidobacterium animalis* and *Methanobrevibacter smithii*. *International Journal of Obesity*, 36, 817 - 825.
- Mitchell, D. A., Von Meien, O. F., Krieger, N., & Dalsenter, F. D. (2004). A review of recent developments in modeling of microbial growth kinetics and intraparticle phenomena in solid-state fermentation. *Biochemical Engineering Journal*, 17, 15 - 26.
- Montgomery, D. C., Peck, E. A., & Vining, G. G. (2006). *Introducción al Análisis de Regresión Lineal* (3a ed.). México: CECSA.
- Myers, J. A., Curtis, B. S., & Curtis, W. R. (2013). Improving accuracy of cell and chromophore concentration measurements using optical density. *BMC Biophysics*, 6(4), 1 - 15.
- Nancib, N., Nancib, A., Boudjelal, A., Benslimane, C., Blanchard, F., & Boudrant, J. (2001). The effect of supplementation by different nitrogen sources on the production of lactic acid from date juice by *Lactobacillus casei* subsp. *raamnosus*. *Bioresourse Technology*, 78, 149 - 153.
- Nelson, D. L., & Cox, M. M. (2013). *Lehninger Principles of Biochemistry* (6° ed.). Nueva York: W. H. Freeman and Company.
- Nyholm, N., Sørensen, P. S., & Kusk, K. O. (1992). STATISTICAL TREATMENT OF DATA FROM MICROBIAL TOXICITY TESTS. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 11, 157 - 167.
- Nyholm,, N., Sorensen, P. S., & Kusk, K. O. (1992). Statistical Treatment of data from Microbial Toxicity Tests. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 11, 157 - 167.
- Observatorio Mexicano de Enfermedades No Transmisibles. (2013). *Estrategia Nacional para la Prevención y Control del Sobrepeso, la Obesidad y la Diabetes*. Monterrey: Universidad Autónoma de Nuevo León.

- Organización Mundial de la Salud. (2006). *Definition and Diagnosis of Diabetes Mellitus and Intermediate Hyperglycemia*. Ginebra: WHO / International Diabetes Federation.
- Organización Mundial de la Salud. (2010). *Package of essential noncommunicable (PEN) disease interventions for primary health care in low-resource settings*. París: WHO Library Cataloguing-in-Publication Data.
- Organización Mundial de la Salud. (junio de 2017). *WHO - media centre*. Recuperado el 28 de octubre de 2017, de Noncommunicable diseases: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs355/en/>
- Organización Mundial de la Salud. (octubre de 2017). *WHO Media Centre*. Recuperado el 10 de noviembre de 2017, de Obesity and overweight: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs311/en/>
- Organización Mundial de la Salud. (2017). *WHO Noncommunicable diseases and their risk factors*. Recuperado el 4 de noviembre de 2017, de Prevention of noncommunicable diseases: <http://www.who.int/ncds/prevention/introduction/en/>
- Ott, S. J., Musfeldt, M., Wenderoth, D. F., Hampe, J., Brant, O., Fölsch, U. R., . . . Schreiber, S. (2004). Reduction in diversity of the colonic mucosa associated bacterial microflora in patients with active inflammatory bowel disease. *GUT*, 53, 685 - 693.
- Pyzdek, T., & Keller, P. (2010). *Six Sigma Handbook - A complete guide for Green Belts, Black Belts, and Managers at all levels* (3a ed.). Nueva York, EE. UU.: McGraw Hill.
- Qin, J., Li, R., Raes, J., Arumugam, M., Solvsten-Burgdorf, K., Manichanh, C., . . . Wang, J. (2010). A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing. *Nature*, 464, 59 - 67.
- Rajkumar, H., Mahmood, N., Kumar, M., Reddy Varikuti, S., Reddy Challa, H., & Prakash Myakala, S. (2014). Effect of Probiotic (VSL#3) and Omega-3 on Lipid Profile, Insulin Sensitivity, Inflammatory Markers, and Gut Colonization in Overweight Adults: A Randomized, Controlled Trial. *Mediators of Inflammation*, 1 - 8.
- Ríos, E., Mejía-Ruiz, H., & Álvarez-Castañeda, S. T. (2009). Marcadores moleculares: una revolución en la zoología. *Ciencia*, 5 - 13.

- Rosner, B. (2016). *Fundamentals of Biostatistics* (8a ed.). Boston, EE.UU.: Cengage Learning.
- Samuel, V. T., & Shulman, G. I. (2012). Mechanisms for Insulin Resistance: Common Threads and Missing Links. *Cell*, 148, 852 - 871.
- Schepers, A. W., Thibault, J., & Lacroix, C. (2002). Lactobacillus helveticus growth and lactic acid production during pH-controlled batch cultures in whey permeate/yeast extract medium. Part I. multiple factor kinetic analysis. *Enzyme and Microbial Technology*, 30, 176 - 186.
- Secretaría de Gobernación. (2013). *Plan Nacional de Desarrollo 2013 - 2018*. México D.F.: Secretaría de Gobernación.
- Secretaría de Salud. (1995). *NOM-092-SSA1-1994, Bienes y Servicios. Método para la cuenta de bacterias aerobias en placa*. México D.F.: Diario Oficial de la Federación.
- Secretaría de Salud. (2016). *Encuesta Nacional de Salud y Nutrición de Medio Camino 2016*. México, D.F.: Secretaría de Salud.
- SIGMA-ALDRICH. (19 de noviembre de 2018). *MRS broth for microbiology*. Obtenido de <https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sial/69966?lang=es®ion=MX>
- Snee, R. (2009). Digging the Holistic Approach: Rethinking Business Improvement to Improve the Bottom Line. *Quality Progress*, 52 - 54.
- Snee, R. (2012). Lean Six Sigma - getting better all the time. *International Journal of Lean Six Sigma*, 1(1), 9 - 29.
- Sociedad Europea de Neurogastroenterología y Motilidad. (11 de Marzo de 2015). *Gut Microbiota for Health*. Recuperado el 13 de Abril de 2018, de Disbiosis: <http://www.gutmicrobiotaforhealth.com/es/glossary/disbiosis/>
- Song, D., Ibrahim, S., & Hayek, S. (2012). Recent Application of Probiotics in Food and Agricultural Science. En E. Rigobelo, *Probiotics* (págs. 3 - 36). IntechOpen.
- Stanbury, P. F., Whitaker, A., & Hall, S. J. (2003). *Principles of Fermentation Technology* (2° ed.). Burlington, EE.UU.: Butterworth Heinemann.
- Statistical Process Control. (noviembre de 2018). *What is statistical process control?* Obtenido de <http://www.statisticalprocesscontrol.info/glossary.html#Thesixfactors>

- Turnbaugh, P. J., Ley, R. E., Mahowald, M. A., Magrini, V., Mardis, E. R., & Gordon, J. I. (2006). An obesity-associated gut microbiome with increased capacity for energy harvest. *Nature*, 444(21), 1027 - 1031.
- Tyo, K. E., Kocharin, K., & Nielsen, J. (2010). Toward design-based engineering of industrial microbes. *Current Opinion in Microbiology*, 13, 255 - 262.
- Ullman, F., & Boutellier, R. (2008). A case study of lean drug discovery: from project driven research to innovation studios and process factories. *Drug Discovery Today*, 13(11/12), 543 - 550.
- Velioglu, Y. S., Mazza, G., Gao, L., & Oomah, B. D. (1998). Antioxidant Activity and Total Phenolics in Selected Fruits, Vegetables, and Grain Products. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 46, 4113 - 4117.
- Villaseñor-Contreras, A., & Galindo-Cota, E. (2009). *Manual de Lean Manufacturing - Guía Básica* (2a ed.). México, D. F.: Limusa.
- Voreades, N., Kozil, A., & Weir, T. L. (2014). Diet and the development of the human intestinal microbiome. *Frontiers in Microbiology*, 5, 1 - 10.
- Wang, J., Tang, H., Zhang, C., Zhao, Y., Derrien, M., Rocher, E., . . . Shen, J. (2015). Modulation of gut microbiota during probiotic-mediated attenuation of metabolic syndrome in high fat diet-fed mice. *International Society for Microbial Ecology*, 9, 1 - 15.
- Warrington, L. (2008). *Weibull Analysis: Methodology, Applications, Benefits and Pitfalls*. Ontario: AR&MS Tutorial Notes.
- Weiner, R., & Kelley, M. (2016). *Translating Molecular Biomarkers Into Clinical Assays : Techniques And Applications*. (Cham, Ed.) Edison, NJ: Springer.
- West, C. E., Gothefors, L., Granström, M., Käyhty, H., Hammarström, M.-L. K., & Hernell, O. (2007). Effects of feeding probiotics during weaning on infections and antibody responses to diphtheria, tetanus and Hib vaccines. *Pediatric Allergy and Immunology*, 19, 53 - 60.
- Xing-Ming, Z., & Qin, G. (2013). *Bioinformatics for Diagnosis, Prognosis and Treatment of Complex Diseases*. Springer.

Yemm, E. W., & Willis, A. J. (1954). The estimation of carbohydrates in plant extracts by anthrone.
Biochemical Journal, 57(3), 508 – 514.

ANEXOS

1. PROJECT CHARTER DEL PROCESO DE PRODUCCIÓN DE PROBIÓTICOS

PROJECT CHARTER			
Nombre del proyecto:		Producción de probióticos por OGA a escala piloto (7 L)	
Fecha de revisión:		19/11/2018	
Reto del negocio		Objetivo del proyecto	
<p>Optimizar y estandarizar el proceso de producción de biomasa probiótica de tres microorganismos, <i>Lactobacillus plantarum</i>, <i>Lactobacillus rhamnosus</i> y <i>Saccharomyces boulardii</i>, en un medio económicamente viable (MBT) a base de melazas de betabel, azúcar y extracto de té verde, a nivel piloto con el fin de obtener rendimientos celulares similares a los obtenidos por medios comerciales pero con una reducción de costos de, al menos, 50 %.</p>		<p>Reducir el impacto financiero por el medio de cultivo de a, cuando menos, el 50 % del costo del medio comercial, utilizando un medio optimizado (MBT) a partir de los resultados de un RSM-DOE.</p> <p>Lograr rendimientos celulares ($Y_{X/N}$) de, cuando menos, 1×10^9 UFC mL⁻¹ (los mismos que se obtienen con medios comerciales) utilizando un medio optimizado (MBT) a nivel piloto (7 L).</p>	
Alcance		Impacto Financiero	
<p>Proceso a nivel laboratorio (0.25 L) y su posterior escalamiento a nivel piloto (7 L); posteriormente, poder replicar las condiciones en un proceso industrial de no menos de 100 L.</p>		<p>Reducir el impacto financiero por el medio de cultivo de a, cuando menos, el 50 % del costo del medio comercial, utilizando un medio optimizado (MBT) a partir de los resultados de un RSM-DOE.</p>	
Métricas		Equipo	
<p>Impacto financiero, FPY, viabilidad celular, entradas X al proceso (temperatura, oxígeno disuelto, agitación, concentración de sustrato, tiempo de proceso, pH).</p>		Nombre	Rol
Plan de proyecto		Peña Partida	José Carlos
			Lider del proyecto
Proceso	Fecha de conclusión	Fase del objetivo	
Documentación del problema	19/11/2018	100.00%	
Medición del proceso	19/11/2018	100.00%	
Optimización e implementación de mejoras	19/11/2018	100.00%	
Control del proceso mejorado	19/11/2018	100.00%	
Documentación de la situación de mejora	19/11/2018	100.00%	
Firmas y fechas			
Campeón:	Black Belt:	Lider:	Finanzas:
		José Carlos Peña Partida	

2. A3 DEL PROCESO DE PRODUCCIÓN DE PROBIÓTICOS

1. ¿Cuál es el problema?

Descripción:

Declaración de problema:

Comercialmente, el costo de materiales para el crecimiento de este tipo de microorganismos representa \$4,242.00 MXN/kg.

Adicional a esto, los rendimientos de producción de biomasa (Y_{XS}) suelen ser bajos (inferiores a 45 %). En el estado ideal se busca sea tener rendimientos (Y_{XS}) similares o superiores a 45 % con costos de materiales inferiores en, al menos, 50 % con respecto a los costos del medio comercial.

Optimización de costos relacionados con la producción del medio de cultivo para probióticos

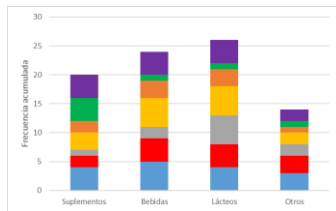


Gráfico de barras de frecuencias acumuladas de necesidades de consumidores agrupadas en sectores de consumo de probióticos. ■ impacto en la salud, ■ costo, ■ variedad de presentaciones, ■ variedad de puntos de venta, ■ información, ■ vida de anaquel, ■ aval por centros de

	POSITIVOS	NEGATIVOS
INTERNOS	Fortalezas Diseño de un proceso innovador que ya existe en el mercado. Optimización del medio de cultivo a partir de diseños experimentales con pruebas en laboratorio. Proceso completamente diseñado por un equipo especializado en el tema.	Debilidades No hay financiamiento del proyecto ya que se trata de un proyecto académico interno de ITSO. Inversión inicial alta debido a la tecnificación del proceso y la capacitación de los operadores.
EXTERNOS	Oportunidades Poca competencia nacional, así como prácticamente nula regulación al respecto de la comercialización del producto. Tasas de crecimiento constantes cercanas al 10 % anual tanto en el mercado nacional como internacional.	Amenazas Tipo de cambio fluctuante que impacta sobre costo de materiales. Desconocimiento de la gente acerca del producto lo cual pudiera representar una colocación lenta en el mercado.

Análisis FODA del proceso de producción de probióticos

2. Definiendo el problema

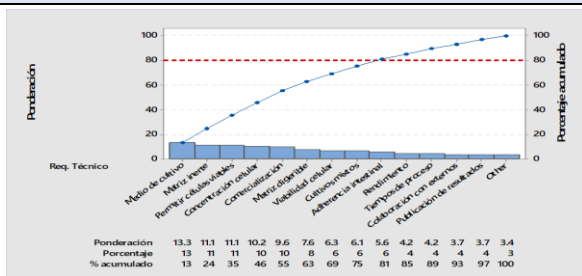


Diagrama de Pareto de los requerimientos técnicos para poder llevar a cabo la producción de probióticos en CCLA

C	I	O	C
Mercado de abastos	Betabeles	1. Recepción de materias primas	Complejo probiótico
Costico	Azúcar	2. Inspección de materias primas	COFEPRI
Raff Lactoinredientes	Extracto de levadura	3. Acondicionamiento de materias primas	SSA
ITSO	Té verde	4. Elaboración del medio MBT	FPF
Difco	LP, LR y SB	5. Caracterización del medio MBT	Orden de producción
Sigma	Biorreactores	6. Preservativos y	
Meyer	Bombas	7. Acondicionamiento de reactores	
Applikon	Tuberías	8. Esterilización de reactores con peróxido de hidrógeno	
Masterflex	Sensores (pH, O ₂ , biomasa)	9. Inoculación de reactores	
Torrey	Reactivos de laboratorio	10. Fermentación en CCLA	
	Balanzas	11. Caracterización de productos de fermentación	
	Orden de producción	12. Secado de biomasa	
	Operadores		
	Inspectores		
	Normatividad		

SIPOC del proceso de producción de probióticos en CCLA

3. Metas

- Reducir el impacto financiero por el medio de cultivo a, cuando menos, el 50 % del costo del medio comercial, utilizando un medio optimizado (MBT) a partir de los resultados de un RSM-DOE.
- Lograr rendimientos celulares (Y_{XS}) de, cuando menos, 45 % con viabilidad (los mismos que se obtienen con medios comerciales) utilizando un medio optimizado (MBT) a nivel piloto (7 L).
- Lograr una concentración celular de, cuando menos, 1×10^8 UFC mL⁻¹ (la misma que se obtiene con medios comerciales) utilizando

4. Análisis de la causa raíz

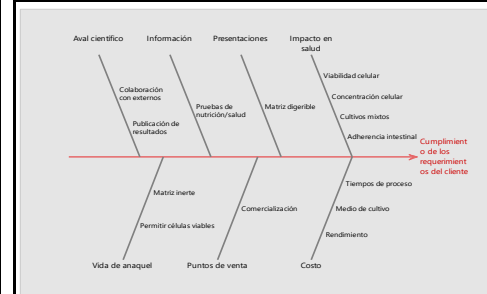
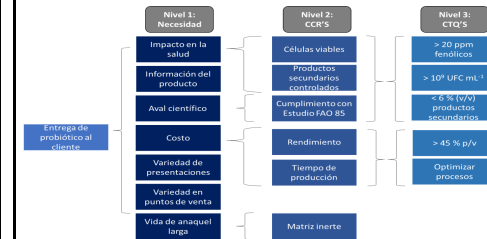


Diagrama de causa-raíz de las relaciones entre requerimientos del cliente y requerimientos técnicos para la producción de probióticos



CTQ de las necesidades del cliente y las estrategias para su solución

Conclusiones de la matriz causa y efecto

Enfoque en el proceso, principalmente en la formulación de un medio de cultivo análogo al MRS para reducir costos y maximizar rendimiento y viabilidad celular.

Estandarizar las etapas del proceso de producción de probióticos por CCLA, así como el flujo de operación para reducir tiempos y maximizar eficiencia.

Las principales características que espera el cliente al momento de recibir el producto terminado es que tenga un impacto positivo en la salud (relacionado con la concentración y viabilidad celular) y de costo accesible.

Un medio de cultivo mal diseñado, así como un proceso poco eficiente, impactan directamente sobre las principales expectativas del cliente y sobre los costos de producción.

5. Herramientas para medición y análisis

1	Especificaciones de operación.
2	DoE
3	Gráficos de control y capacidad del proceso.
4	Análisis de regresión no lineales.
5	Técnicas estandarizadas de laboratorio.

6. Tiempos y Actividades

Proceso	Fecha de conclusión	Fase del objetivo
D: Documentación del problema	05/12/2018	100.00%
M: Medición y estandarización del proceso	05/12/2018	100.00%
A: Estandarización de las técnicas	05/12/2018	100.00%
I: Optimización e implementación de mejoras	05/12/2018	100.00%
C: Documentación de la situación de mejora	05/12/2018	100.00%

3. CORRIDAS DE LOS DISEÑOS EXPERIMENTALES

EXTRACCIÓN

Orden estándar	Corrida	Bloque	A: Temperatura (°C)	B: Tiempo (min)	Respuesta: Contenido fenólico (ppm)
4	1	Bloque 1	80	1.0	0.01481
11	2	Bloque 1	70	2.5	0.02117
1	3	Bloque 1	94	1.0	0.01715
10	4	Bloque 1	80	2.5	0.02181
17	5	Bloque 1	70	4.0	0.02464
18	6	Bloque 1	70	4.0	0.02359
13	7	Bloque 1	94	4.0	0.02259
5	8	Bloque 1	70	1.0	0.01419
12	9	Bloque 1	70	2.5	0.02181
2	10	Bloque 1	94	1.0	0.01606
3	11	Bloque 1	80	1.0	0.01616
14	12	Bloque 1	94	4.0	0.02172
6	13	Bloque 1	70	1.0	0.01417
7	14	Bloque 1	94	2.5	0.0212
9	15	Bloque 1	80	2.5	0.0213
8	16	Bloque 1	94	2.5	0.02182
16	17	Bloque 1	80	4.0	0.02264
15	18	Bloque 1	80	4.0	0.02223

OPTIMIZACIÓN DEL MEDIO MBT

Orden estándar	Corrida	Bloque	A: pH	B: Fuente de carbono (g L ⁻¹)	C: Extracto de levadura (g L ⁻¹)	D: Extracto de té verde (mL L ⁻¹)	Respuesta: Crecimiento de biomasa (g L ⁻¹)
67	1	Block 1	6.00	35.00	6.00	6.00	1.21463
34	2	Block 1	4.33	18.28	4.66	3.33	0.282929
70	3	Block 1	5.00	10.00	6.00	6.00	0.19321
77	4	Block 1	5.00	35.00	6.00	2.00	0.672612
45	5	Block 1	4.33	51.72	7.34	3.33	0.610326
42	6	Block 1	4.33	18.28	7.34	3.33	0.306616
31	7	Block 1	5.67	51.72	7.34	8.67	0.771806
71	8	Block 1	5.00	60.00	6.00	6.00	0.748157
26	9	Block 1	4.33	18.28	7.34	8.67	0.350795
82	10	Block 1	5.00	35.00	6.00	6.00	0.491645
78	11	Block 1	5.00	35.00	6.00	2.00	0.475493
76	12	Block 1	5.00	35.00	8.00	6.00	0.89405
55	13	Block 1	5.67	51.72	4.66	8.67	0.813976
66	14	Block 1	4.00	35.00	6.00	6.00	0.537035
38	15	Block 1	4.33	51.72	4.66	3.33	0.731812
22	16	Block 1	4.33	51.72	4.66	8.67	0.741427
33	17	Block 1	4.33	18.28	4.66	3.33	0.171714
35	18	Block 1	5.67	18.28	4.66	3.33	0.252286
47	19	Block 1	5.67	51.72	7.34	3.33	0.678039

56	20	Block 1	5.67	51.72	4.66	8.67	0.769485
91	21	Block 1	5.00	35.00	6.00	6.00	0.412571
23	22	Block 1	5.67	51.72	4.66	8.67	0.889125
57	23	Block 1	4.33	18.28	7.34	8.67	0.365906
83	24	Block 1	5.00	35.00	6.00	6.00	0.459962
21	25	Block 1	4.33	51.72	4.66	8.67	0.406794
1	26	Block 1	4.33	18.28	4.66	3.33	0.558228
88	27	Block 1	5.00	35.00	6.00	6.00	0.448532
40	28	Block 1	5.67	51.72	4.66	3.33	0.716543
54	29	Block 1	4.33	51.72	4.66	8.67	0.541372
75	30	Block 1	5.00	35.00	8.00	6.00	0.622545
4	31	Block 1	5.67	18.28	4.66	3.33	0.300818
3	32	Block 1	5.67	18.28	4.66	3.33	0.404545
86	33	Block 1	5.00	35.00	6.00	6.00	0.494025
29	34	Block 1	4.33	51.72	7.34	8.67	0.758746
87	35	Block 1	5.00	35.00	6.00	6.00	0.593827
50	36	Block 1	4.33	18.28	4.66	8.67	0.419849
10	37	Block 1	4.33	18.28	7.34	3.33	0.480747
9	38	Block 1	4.33	18.28	7.34	3.33	0.332945
30	39	Block 1	4.33	51.72	7.34	8.67	1.55411
59	40	Block 1	5.67	18.28	7.34	8.67	0.356835
32	41	Block 1	5.67	51.72	7.34	8.67	0.753433

69	42	Block 1	5.00	10.00	6.00	6.00	0.252286
61	43	Block 1	4.33	51.72	7.34	8.67	1.102
36	44	Block 1	5.67	18.28	4.66	3.33	0.340384
11	45	Block 1	5.67	18.28	7.34	3.33	0.357553
48	46	Block 1	5.67	51.72	7.34	3.33	0.66322
19	47	Block 1	5.67	18.28	4.66	8.67	0.618951
81	48	Block 1	5.00	35.00	6.00	6.00	0.599825
37	49	Block 1	4.33	51.72	4.66	3.33	0.655274
52	50	Block 1	5.67	18.28	4.66	8.67	0.40926
80	51	Block 1	5.00	35.00	6.00	10.00	0.484184
14	52	Block 1	4.33	51.72	7.34	3.33	0.713671
24	53	Block 1	5.67	51.72	4.66	8.67	0.498518
15	54	Block 1	5.67	51.72	7.34	3.33	0.670589
49	55	Block 1	4.33	18.28	4.66	8.67	0.422809
18	56	Block 1	4.33	18.28	4.66	8.67	0.471198
20	57	Block 1	5.67	18.28	4.66	8.67	0.320475
46	58	Block 1	4.33	51.72	7.34	3.33	0.598019
74	59	Block 1	5.00	35.00	4.00	6.00	0.491546
5	60	Block 1	4.33	51.72	4.66	3.33	0.680085
62	61	Block 1	4.33	51.72	7.34	8.67	0.525285
68	62	Block 1	6.00	35.00	6.00	6.00	0.394287
6	63	Block 1	4.33	51.72	4.66	3.33	0.748157

7	64	Block 1	5.67	51.72	4.66	3.33	0.639664
12	65	Block 1	5.67	18.28	7.34	3.33	0.383201
51	66	Block 1	5.67	18.28	4.66	8.67	0.373328
2	67	Block 1	4.33	18.28	4.66	3.33	0.966328
60	68	Block 1	5.67	18.28	7.34	8.67	0.347988
84	69	Block 1	5.00	35.00	6.00	6.00	0.473583
90	70	Block 1	5.00	35.00	6.00	6.00	0.535417
92	71	Block 1	5.00	35.00	6.00	6.00	0.533804
73	72	Block 1	5.00	35.00	4.00	6.00	0.501536
43	73	Block 1	5.67	18.28	7.34	3.33	0.535744
13	74	Block 1	4.33	51.72	7.34	3.33	0.873211
53	75	Block 1	4.33	51.72	4.66	8.67	0.693187
39	76	Block 1	5.67	51.72	4.66	3.33	0.711524
27	77	Block 1	5.67	18.28	7.34	8.67	0.339701
65	78	Block 1	4.00	35.00	6.00	6.00	0.532732
17	79	Block 1	4.33	18.28	4.66	8.67	0.34974
41	80	Block 1	4.33	18.28	7.34	3.33	0.337588
8	81	Block 1	5.67	51.72	4.66	3.33	0.684195
64	82	Block 1	5.67	51.72	7.34	8.67	0.783515
28	83	Block 1	5.67	18.28	7.34	8.67	0.717263
72	84	Block 1	5.00	60.00	6.00	6.00	0.583405
63	85	Block 1	5.67	51.72	7.34	8.67	0.86103

16	86	Block 1	5.67	51.72	7.34	3.33	0.772581
89	87	Block 1	5.00	35.00	6.00	6.00	0.523176
85	88	Block 1	5.00	35.00	6.00	6.00	0.44763
58	89	Block 1	4.33	18.28	7.34	8.67	0.666605
25	90	Block 1	4.33	18.28	7.34	8.67	0.302333
79	91	Block 1	5.00	35.00	6.00	10.00	0.59562
44	92	Block 1	5.67	18.28	7.34	3.33	0.311899

ESTERILIZACIÓN

Orden estándar	Corrida	Bloque	A: Temperatura (°C)	B: Tiempo (min)	Respuesta: Contenido fenólico (ppm)
16	1	Bloque 1	120	15	0.0039
5	2	Bloque 1	100	60	0.004
9	3	Bloque 1	120	105	0.0037
7	4	Bloque 1	80	105	0.0041
2	5	Bloque 1	100	15	0.004
17	6	Bloque 1	80	105	0.0045
8	7	Bloque 1	100	105	0.0042
10	8	Bloque 1	80	15	0.0045
18	9	Bloque 1	100	60	0.0041
14	10	Bloque 1	80	60	0.0044
15	11	Bloque 1	120	105	0.0037
1	12	Bloque 1	80	15	0.0044
4	13	Bloque 1	80	60	0.0044
3	14	Bloque 1	120	15	0.0037
6	15	Bloque 1	120	60	0.0038
11	16	Bloque 1	100	60	0.0041
13	17	Bloque 1	100	15	0.004
12	18	Bloque 1	120	105	0.0037